

組換えコレラ毒素 B サブユニットの
粘膜アジュバントとしての作用機構に関する研究

乙第45号

2005 年

前山順一

組換えコレラ毒素 B サブユニットの
粘膜アジュバントとしての作用機構に関する研究

2005 年

前山順一

目次
【総論の部】

序論	4
略号	9
第一章 マクロファージ (Mφ) による cAMP とサイトカイン産生に対するコレラ毒素 (CT) 及びその B サブユニット (CTB) の影響	
1-1. CT 及び CTB の cAMP 産生に対する作用	10
1-2. 組換えコレラ毒素 B サブユニット (rCTB) 及び CT の Mφ に対するサイトカイン産生作用	11
考察	12
第二章 組換えコレラ毒素 B サブユニット (rCTB) の体液性免疫応答に対する粘膜アジュバント作用	
2-1. 卵アルブミン (OVA) 免疫マウスの抗体産生と脾臓細胞によるサイトカイン産生	15
2-2. ジフテリアトキソイド (DT) 免疫マウスの鼻咽頭関連リンパ組織及び脾臓のサイトカイン産生細胞の解析	18
考察	20

第三章 組換えコレラ毒素 B サブユニット (rCTB) の細胞性免疫応答における粘膜アジュバント作用

3-1.	モルモットにおける rCTB の細胞性免疫増強作用	22
3-2.	マウスにおける rCTB の細胞性免疫増強作用	28
	考察	31

第四章 マウスマクロファージ (M ϕ) のサイトカイン産生及び mRNA 発現に対する組換えコレラ毒素 B サブユニットの影響

4-1.	LPS 刺激によるサイトカイン産生に対する rCTB の影響	34
4-2.	LPS 以外の物質での M ϕ 刺激に対する rCTB の影響	40
	考察	45
	総括	46
	謝辞	50

【実験の部】

	一般事項	51
	第一章に関する実験	54

第二章に関する実験	55
第三章に関する実験	57
第四章に関する実験	60
引用文献	63

総論の部

【序論】

感染症予防のためのワクチンの改良は近年著しい進歩を見せている。感染症への対策として、特にウイルス性の感染症では、ワクチンによる予防が最も有効かつ経済的な方法であるといわれており、世界保健機構（WHO）は 6 種類の疾病に対するグローバルなキャンペーンとしての予防接種拡大計画を展開した。しかし、現在もなお、アジア・アフリカの発展途上国においては、感染症が小児の最大の死亡原因である。また、新興・再興感染症に対応するため、エイズワクチン、重症急性呼吸器症候群（SARS）ワクチン等、新たなワクチンの開発も急がれており、ワクチンの重要性は発展途上国はもとより先進国においても増すばかりである。我が国においては、生活環境の改善と予防接種によって、多くの感染症は著しい減少傾向を示しているが、現行のワクチンにおいても、効果と安全性の両面で改善すべき点があるとされている。

これからのワクチンの方向性としては、注射によらないワクチン、一回投与で有効なワクチン、耐熱性ワクチン、多価ワクチン等多岐にわたり、さまざまな戦略からの開発・改良が試みられている（1）。その中で、血清中の抗原特異的 IgG 抗体産生だけでなく、病原体の主たる感染経路である粘膜局所での分泌型 IgA 抗体を産生させるワクチンの開発も重要な戦略の一つであると考えられている。しかしながら、現行の注射によるワクチン投与では、末梢リンパ組織や脾臓などの全身系免疫応答、いわゆる抗原特異的血清 IgG 抗体産生または抗原特異的細胞性免疫応答は誘導できるものの、粘膜面での免疫応答を誘導することが出来ない。すなわち、感染成立後の発症防御はできても、侵入門戸からの感染そのものの防御は出来ないとされている。一方、経鼻、経口投与で代表される粘膜投与によるワクチン接種の場合は、投与した粘膜部位の分泌型 IgA 抗体産生を増強させるばかりでなく、粘膜免疫循環帰巢経路、いわゆる汎粘膜免疫機構を介し全身

の粘膜面に免疫応答を誘導することができ、さらには血清中の抗原特異的 IgG 抗体産生増強も含む全身系免疫機構の応答をも誘導することができる(2, 3)。このように、粘膜からの免疫は発症防御ばかりでなく、感染部位での防御が期待できることが大きな利点の一つである。なぜならば感染症による死亡原因の上位に位置する感染症では、破傷風とマラリアを除けば、それらの病原体は主に粘膜を介して感染するからである。また、注射により投与される現行のワクチンは、幼児に対し大変な苦痛と恐怖を与える上に、投与局所の腫れや発熱、さらには即時型アレルギー反応や脳炎の発生が認められた経緯もある。一方、粘膜投与では生体への侵襲や副作用も少ないといわれており、更には粘膜投与は接種の簡便性にもすぐれている。このように、投与方法が簡単で、安全性、経済性にもすぐれている粘膜ワクチンは次世代のワクチンの一つとして期待される。それを裏付けるかのように、WHO 主導の “The Children’s Vaccine Initiative” に関連する報告によると、現行の注射によるワクチン接種から経口、経鼻等で投与される粘膜ワクチンへの移行が強く求められている (4)。

近年の精製技術の向上と組換え DNA 技術の導入により、ワクチンとして使用される抗原のコンポーネント化やペプチド化等が進められ、ワクチンの安全性は向上したが、同時にその免疫原性の低下も生じ、ワクチン抗原単独での粘膜投与を考えた場合に問題となる。更に、粘膜組織の性状に起因した抗原の安定性や粘膜免疫担当細胞への抗原の確実な輸送といった問題点も認められる。すなわち粘膜組織には、外界からの危険な異物の侵入を阻止するために、粘液層や粘液に含まれる非特異的活性物質、分解酵素、界面活性物質及び上皮細胞層等による何重ものバリエーが存在しており (5)、抗原の単独投与では十分なワクチン効果が得られない場合が多い。このような問題点を克服するためには、粘膜免疫応答を増強する粘膜アジュバントや経粘膜ワクチンキャリアの開発、あるいは胃酸やタンパク分解酵素に抵抗性のあるデリバリーシステムの構築が必要であり、さまざまな

研究が行われている (6, 7, 8, 9)。特に、安全で免疫増強作用にすぐれた粘膜アジュバントの開発は、粘膜ワクチンの実用化にとって解決すべき課題のひとつである。

現在、粘膜アジュバントに関しては、さまざまな物質について研究が進められているが、代表的なものとして細菌毒素及びその遺伝子組換え体、リポソーム、DNA、サイトカインなどが挙げられる (6)。これらのなかでも最も良く知られている粘膜アジュバントはコレラ毒素 (CT) であり、CT は非常に強力な粘膜アジュバントとして現在に至るまでに多くの研究がなされている (6, 10, 11, 12, 13)。CT は 1 分子の A サブユニット (CTA) と 5 分子の B サブユニット (CTB) から構成され、毒性を示す CTA は ADP-リボシル化酵素であり、CTB は多くのほ乳類細胞表面に存在するガングリオシド GM1 に結合する活性を有する (14)。CT の粘膜アジュバントのメカニズムとしては、(a) CT とともに投与された抗原の粘膜上皮細胞層からの取り込みの亢進、(b) 抗原提示細胞表面の共刺激分子の発現や、抗原提示細胞からの IL-1 や IL-6 などのサイトカイン産生の亢進による抗原提示の増強、(c) 抗原特異的及び CT 特異的 CD4+T 細胞の誘導、(d) 感作 T 細胞から産生される IL-4 による B 細胞からの IgG 1 及び IgA 産生増強、(e) 粘膜上皮層から産生される抑制性サイトカインによる CD8+T 細胞機能の阻害などが挙げられ、CT の作用によってこれらの一連の反応が起こることになるといわれている (6)。しかしながら、これらの現象が捉えられているとはいえ、未だに CT のアジュバント作用の機構が十分に解明されたとはいえない。しかも CT はその毒性も非常に強く、CT そのものを直接人体には適用できない。そのため、CT の毒素活性を担う CTA (ADP-リボシル化酵素) の活性中心に変異を加えたミュータント CT やホロ毒素を痕跡程度加えた CTB を用いるなどの工夫が試みられている (15, 16, 17) が、実用化には至っていない。

これまで筆者らは、投与が容易で且つ効果的に粘膜免疫応答を誘導する

粘膜ワクチンの開発のため、それに応用できる安全なアジュバントの候補として組換えコレラ毒素 B サブユニット (rCTB) について検討を行ってきた。

rCTB 標品は、鵜高らによって開発された *Bacillus brevis* 外来タンパク質分泌産生系を利用し、イナバ型コレラ菌 569B 株の CTB 遺伝子を組込んだ *B. brevis*HPD31 (pNU212-CTB) を用いて産生させた (18, 19)。この標品 (rCTB) は、組換えタンパク質であるために、CT より分離精製された CTB と異なりホロ毒素または CTA を含む可能性がなく、また、産生菌がグラム陽性菌のため、菌体由来の生理活性物質であるリポ多糖 (LPS) が混入する恐れもない。この rCTB の安全性評価では、モルモット及びマウスの腹腔マクロファージや培養細胞に対する細胞毒性や、ウサギ皮膚での血管透過性亢進作用を示さず、さらに動物実験による一連の病理組織学的試験においても、接種局所及び全身の臓器いずれにも明確な病理組織学的変化は認められず (20)、rCTB の安全性が確認されている。また rCTB とジフテリアトキソイド (DT)、破傷風トキソイド (TT)、B 型肝炎に対する HBs ワクチンなどの現行ワクチンとの同時経鼻投与では、抗原特異的血清 IgG、IgA 及び粘膜 IgA 抗体価の上昇が認められたが (21, 22, 23, 24, 25)、抗原特異的 IgE 抗体の産生はほとんど認められず (21, 22, 23, 26)、IgE に由来するアレルギー反応には関与しないことも示されている。前述の rCTB と DT および TT との同時経鼻投与実験では、血清中の抗毒素抗体価上昇による毒素チャレンジに対する防御効果が認められた (21, 22)。さらに HBs ワクチンとの同時経鼻投与では IgG 1 と IgG 2 a の産生が同程度に増強されること、すなわち Th 1 と Th 2 がともに同程度刺激され (23)、体液性免疫のみならず細胞性免疫も増強されることが示された。以上のことから、rCTB は安全性が高く、強い抗体産生誘導とともに細胞性免疫応答も増強する優れた粘膜アジュバントとして有用であることが示された。

従来、CT の粘膜アジュバント作用には、毒性の本体である CTA すなわ

ち ADP-リボシル化酵素による cAMP 産生増強作用が大きく関わっているといわれてきた (27)。また、組換え体でない市販の CTB も、微量の CT または CTA が混入しており、それが主なアジュバント作用を担っているともいわれてきた (17)。しかし、rCTB は CTA を含まず、強い粘膜アジュバント作用を示したことから、rCTB は CT や CTA とは異なる機構によってアジュバント作用を発現するものと推察され、その発現機構の解明には rCTB の粘膜ワクチンへの応用のみならず、免疫学的見地からも大きな興味を持たれる。本研究では rCTB のアジュバント作用の発現機構を解明する目的で以下の項目について検討した。

(1) Mφの cAMP 産生やサイトカイン産生に対する CT と rCTB の影響を比較検討し、両者の作用の違いを明らかにする。

(2) 可溶性抗原とともに CT または rCTB を同時に経鼻投与したマウスを用い、体液性免疫に対する CT と rCTB の粘膜アジュバント作用の違いを検討する。

(3) rCTB の細胞性免疫に対する作用を、BCG との同時経鼻投与によって検討する。

(4) 抗原提示細胞モデルとしての Mφを用い、そのサイトカイン産生に対する rCTB の更に詳細な作用を、mRNA レベルで検討する。

【略号】

本論文中に使用した略号を以下に記載する。

ワクチン・アジュバント関連

rCTB	recombinant cholera toxin B subunit
CT	cholera toxin
DT	diphtheria toxoid
TT	tetanus toxoid
PT	pertussis toxoid
HBs	hepatitis B virus surface antigen
BCG	<i>Mycobacterium bovis</i> -bacillus Calmette-Guérin
CFU	colony-forming unit
PPD	purified protein derivative

実験操作・試薬関連

cAMP	cyclic AMP
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ELISPOT	enzyme-linked immunospot
D-PBS	Dulbecco's phosphate-buffered saline
PBS	phosphate-buffered saline
IFN	interferon
IL	interleukin
TNF	tumor necrosis factor
M ϕ	peritoneal macrophages
NALT	nasopharyngeal lymphoid tissue
LPS	lipopolysaccharide
OVA	ovalbumin
FCS	fetal calf serum

第一章 マクロファージ (Mφ) による cAMP とサイトカイン産生に対するコレラ毒素 (CT) 及びその B サブユニット (CTB) の影響

本章では、Mφに対する rCTB と CT の作用の違いを知る目的で、非免疫マウスより採取した Mφを rCTB と CT で刺激し、その cAMP とサイトカイン産生に及ぼす影響を調べた。

1-1. CT と CTB の cAMP 産生に対する作用

非免疫マウス (雌、BALB/c) から採取した Mφを、市販の CT と CTB、及びrCTBの存在下で2時間培養した場合のcAMP産生量を測定した。Fig.1-1に示したように、培養液中の濃度が 1 $\mu\text{g/ml}$ となるように CT を添加した Mφで最も高い cAMP 産生が認められた。これに対して rCTB では、濃度 1 ~50 $\mu\text{g/ml}$ において cAMP 産生はほとんど認められず、無処置コントロールとの間に有意差は認められなかった。一方、3 社から購入した CTB (1 $\mu\text{g/ml}$) を用いた場合は、0.01 $\mu\text{g/ml}$ の CT 存在下で培養した Mφと同程度の cAMP 産生が認められた。

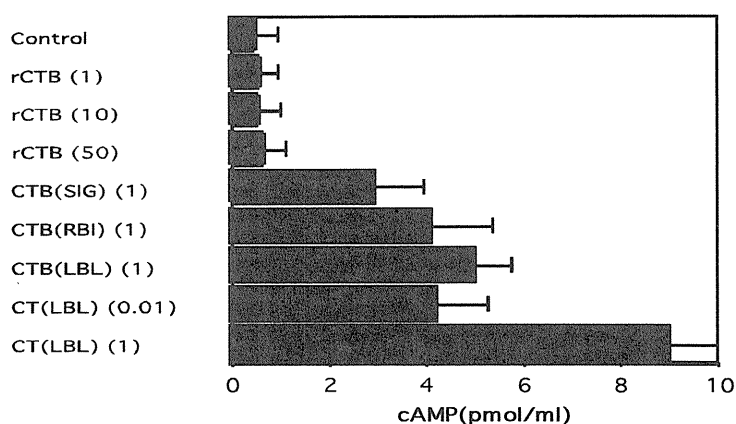


Fig. 1-1. cAMP Production by mouse Mφ. Mφ (1×10^6 cells) were incubated *in vitro* with CT, CTB, or rCTB for 2 hr at 37°C. The bars indicate standard deviations. Control: non-treated cells. CTB purchased from SIG (Sigma-Aldrich Co.), RBI (Research Biochemicals Inc.) and LBL(List Biological Laboratories Inc.) were used. Figure in parenthesis: $\mu\text{g/ml}$.

1-2. rCTB 及び CT のサイトカイン産生に対する作用

次に非免疫マウスから採取した Mφ を rCTB または CT で刺激した時のサイトカイン (IL-1α、IL-1β、IL-6、IL-12) 産生に対する影響を検討した。

Fig.1-2 に示したように、IL-1α と IL-1β の産生に対して、rCTB 及び CT ともに、培養液中の濃度 1~50 µg/ml の範囲では、未処置コントロールとの間に有意差が認められず、rCTB と CT それぞれ単独では IL-1 の産生を誘導できなかった。しかしながら、IL-1 の産生誘導能をもつリポ多糖 (LPS ; 1 µg/ml) と rCTB (10 µg/ml) で同時に刺激した場合、LPS 単独刺激した場合に比べて IL-1α 産生では4倍、IL-1β 産生では2倍以上の産生増強が認められた。一方、LPS とともに CT で同時刺激した場合には、LPS 単独刺激と比べて、IL-1 産生の抑制が認められ、特に IL-1β 産生は 1/2 以下に抑制された。

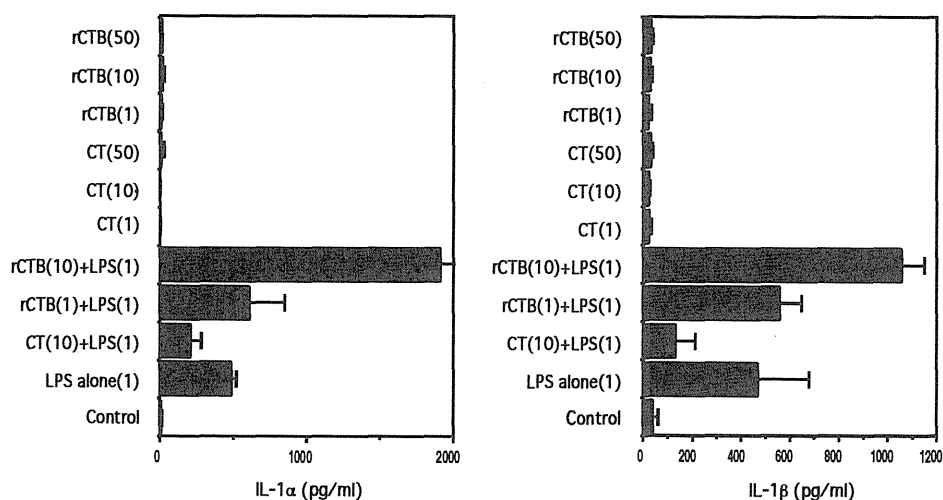


Fig.1-2. Effects of rCTB or CT (LBL) on IL-1α/β production by non-immunized mouse Mφ. Mφ (1×10^6 cells) were incubated *in vitro* with and without LPS (1 µg/ml) for 24 hr at 37°C. Control: non-treated cells. Figure in parenthesis: µg/ml. The bars indicate standard deviations.

IL-6 の産生では、1 $\mu\text{g/ml}$ CT の単独刺激によって顕著な産生誘導が認められ、10 $\mu\text{g/ml}$ の刺激で更に産生が増強された。一方、rCTB では 50 $\mu\text{g/ml}$ の濃度においても IL-6 の産生誘導は認められなかった (Fig.1-3)。IL-12 の産生については、LPS 1 $\mu\text{g/ml}$ と $\text{IFN}\gamma$ 100 U/ml で同時に $\text{M}\phi$ を刺激した系に更に rCTB または CT を添加し、それぞれの IL-12 産生に対する影響を調べた。1 $\mu\text{g/ml}$ 及び 10 $\mu\text{g/ml}$ の CT 添加では、いずれの場合も IL-12 産生が 1/2 程度にまで抑制された。rCTB は用量依存的に IL-12 の産生を抑制し、10 $\mu\text{g/ml}$ の rCTB によって CT (1 及び 10 $\mu\text{g/ml}$) の場合と同程度に抑制された。(Fig.1-4)

考察

CT 及び CTB に関する初期の研究において、CT のアジュバント作用は、CT の ADP リボシル化酵素活性に依存しており、CTB にはアジュバント活性がないといわれていた (27)。しばしば報告にみられる CTB のアジュバント活性は、CT

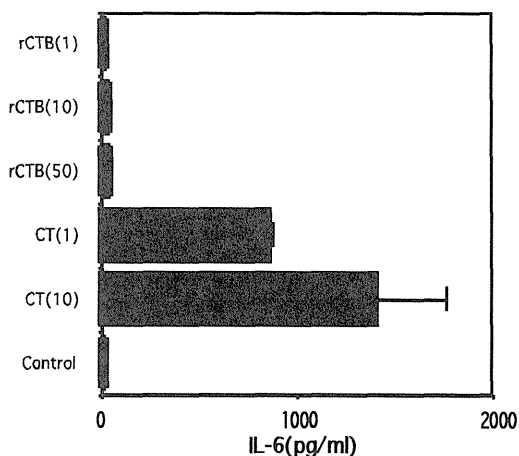


Fig. 1-3. Induction of IL-6 secretion by non-immunized mouse $\text{M}\phi$. $\text{M}\phi$ (1×10^6 cells) were incubated *in vitro* with rCTB or CT (LBL) for 24 hr at 37°C . Control: non-treated cells. Figure in parenthesis: $\mu\text{g/ml}$. The bars indicate standard deviations.

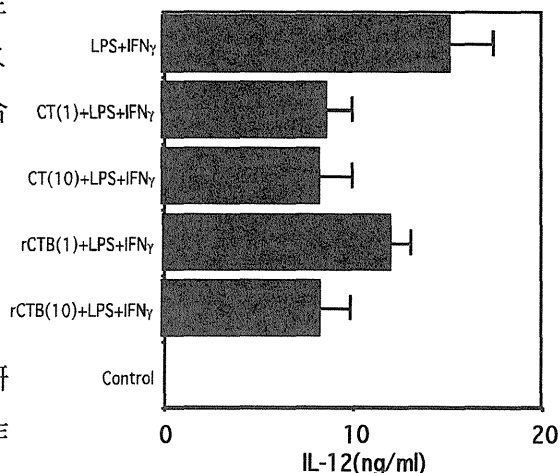


Fig. 1-4. Effects of rCTB or CT (LBL) on IL-12 production by non-immunized mouse $\text{M}\phi$. $\text{M}\phi$ (1×10^6 cells) were incubated *in vitro* with LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) and $\text{IFN}\gamma$ (100 U/ml) for 24 hr at 37°C . Control: non-treated cells. Figure in parenthesis: $\mu\text{g/ml}$. The bars indicate standard deviations.

より CTB を精製する過程でわずかに残った痕跡量の CT の活性ではないかともいわれてきた (17)。本研究で用いた rCTB は組換え体であるために、CT も ADP リボシル化酵素である CTA も含まれていない。それにもかかわらず、rCTB には強いアジュバント作用が認められており (21, 22, 23, 24, 25, 28)、このことは、CT が ADP リボシル化酵素部位以外の部分にもアジュバント作用をもっていることを意味している。

本章では、rCTB のアジュバント作用のメカニズムを解明するために、まず、抗体産生に大きな影響を与える抗原提示細胞のモデルとして M ϕ を用い、それに対する rCTB と CT の作用の違いを検討した。これまでに、CT は単独で M ϕ に対して IL-1 の産生を誘導するという報告 (29, 30) があるが、本研究で得られた成績では、rCTB と CT はいずれも単独では IL-1 の産生を誘導することは出来なかった (Fig. 1-2)。前述の報告では、IL-1 の測定方法がバイオアッセイであり、CT での刺激によって産生された他のサイトカインなどの生理活性物質を検出していた可能性がある。また rCTB は IL-6 の産生も誘導できなかった (Fig. 1-3)。IL-6 産生には、細胞内での cAMP 産生が関与しているといわれており (31, 32)、本研究で得られた結果はそれに一致した。抗体産生における CT のアジュバント作用には、IL-6 が重要な役割を演じている (31, 33) が、rCTB は cAMP と IL-6 いずれの産生も誘導しないため、CT とは異なった機構によってアジュバント作用を示すと推察された。無論、CTB は CT の一部であり、CT は CTB の作用も合わせ持つと考えられるため、両者の主に働く作用機作が異なる可能性が高い。

LPS は *in vitro* で M ϕ などの細胞に IL-1 その他の炎症性サイトカインを産生させることが知られている (34, 35)。本研究では、この LPS 存在下での IL-1 産生に対する rCTB と CT の影響の違いが見いだされた (Fig. 1-3)。すなわち、rCTB は、LPS による M ϕ からの IL-1 α と IL-1 β の産生を増強し、CT は逆に、それを抑制した。CT の示した抑制的作用に関しては細胞毒性が影響したという可能性も否定できないが、cAMP の細胞内の蓄積によって、転写後の IL-1 タンパク質合成過程が阻害されるという報告もある (36)。M ϕ

の IL-1 や TNF- α などのサイトカイン産生に対する rCTB の産生増強作用については、第四章で詳しく論じる。

rCTB と CT は M ϕ からの IL-12 産生を阻害した。rCTB には細胞毒性がほとんど認められないため、この IL-12 の産生阻害作用は細胞死によるものではなく、IL-12 産生機構のいずれかの段階に作用して産生を抑制すると考えられる。IL-12 は、ナイーブ T 細胞から Th1 細胞への分化に関与しており(37)、rCTB は IL-12 の産生を阻害することによって、Th 1 /Th 2 バランス (38) を Th 2 優位にすると推察されるが、詳細は今後の検討課題である。CT は一般的に Th 2 型の免疫系を刺激するといわれており (12, 13, 39, 40, 41, 42, 43)、rCTB と CT は同様の作用機構によって Th 2 型の免疫応答を増強するものと考えられた。

本章では M ϕ に対する rCTB と CT の作用を検討し、rCTB が M ϕ などで代表される抗原提示細胞に CT と異なる機序で作用して、アジュバント作用を示す可能性を示した。

第二章 組換えコレラ毒素 B サブユニット (rCTB) の体液性免疫応答に対する粘膜アジュバント作用

本章では、可溶性抗原とともに rCTB または CT を同時に粘膜投与したマウスについて、脾臓細胞からのサイトカイン産生、鼻咽頭関連リンパ組織 (NALT) および脾臓のサイトカイン産生細胞数を調べることにより、rCTB と CT のアジュバント作用の相違を検討した。

2-1. OVA 免疫マウスの抗体産生と脾臓細胞によるサイトカイン産生

経鼻免疫後のサイトカイン産生に対する rCTB の影響を調べるために、マウスに OVA を rCTB とともに経鼻投与した。rCTB の代りにアジュバントとして CT を同時投与した群と、OVA 単独投与群とを対照とした。まず、rCTB のアジュバント効果を知るために、経鼻免疫後 42 日目における抗原特異的血清 IgG 抗体価を測定した。Fig.2-1 に示したように、rCTB および CT と OVA の同時投与群において、rCTB は CT と同様にアジュバント作用を示し、OVA 単独投与群に比べて血中抗原特異的 IgG 抗体価の明らかな上昇が認められた。この抗体価の上昇は、rCTB 10 μ g/マウス投与群と CT 1 μ g/マウス投与群でほぼ同程度であった。

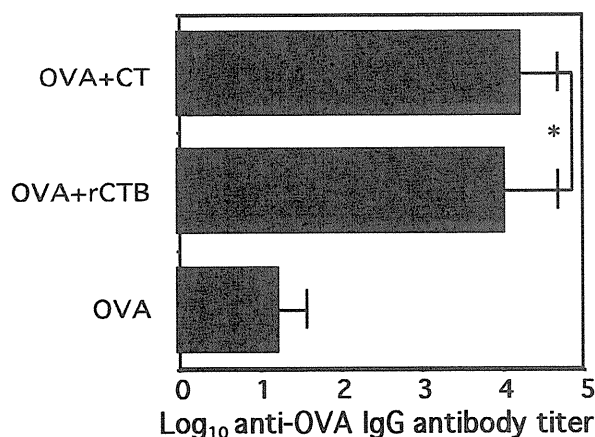


Fig. 2-1. Mouse serum IgG antibody responses to OVA. Mice were intranasally co-administered with OVA (50 μ g/mouse) and rCTB (10 μ g/mouse) or CT (1 μ g/mouse). The bars indicate standard deviations. Asterisk indicates statistically significant difference at $P < 0.01$ between OVA alone and other.

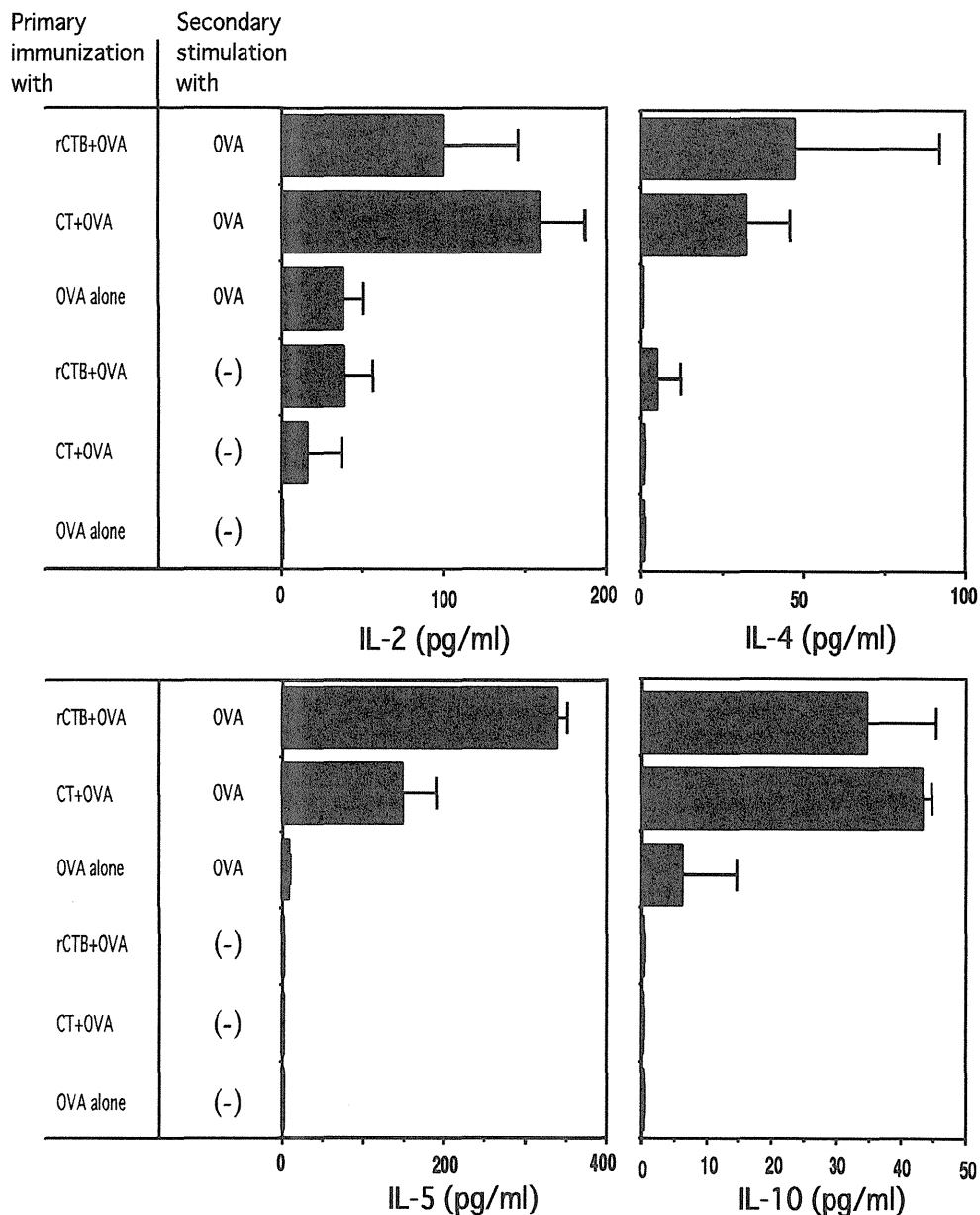


Fig. 2-2. Cytokine production by OVA immunized mouse spleen cells. Spleen cells (5×10^6 cells/ml) were incubated at 37°C for 24 hr with and without OVA ($500 \mu\text{g/ml}$) after intranasal co-administration of OVA ($50 \mu\text{g/mouse}$) and rCTB ($10 \mu\text{g/mouse}$) or CT ($1 \mu\text{g/mouse}$). rCTB+OVA, CT+OVA and OVA alone indicate immunization to mouse with OVA plus mucosal adjuvants (rCTB or CT) or OVA alone. OVA indicate the secondary stimulation *in vitro* with OVA. (-) indicates no secondary stimulation *in vitro*. The bars indicate standard deviations.

次に、抗体価の上昇が同程度であった上記二つの投与群について、サイトカイン (IL-2、IL-4、IL-5、IL-10 および IFN γ) の産生を比較検討した (Fig. 2-2 及び Fig. 2-3)。両投与群のマウス脾臓細胞を、OVA を用いて *in vitro* で抗原二次刺激した場合、いずれのサイトカインについても顕著な産生が認められた。特に rCTB をアジュバントとして免疫した場合の IL-5 の産生が顕著であり、CT による場合のそれと比較して有意差が認められた。IL-2、IL-4、および IL-10 については、rCTB または CT をアジュバントとして用いて免疫した場合、抗原二次刺激によりほぼ同程度の産生が認められた。一方、OVA と rCTB または OVA と CT を同時に経鼻免疫した群の脾臓細胞では、OVA による抗原二次刺激をしなくても、IL-2 については rCTB または CT をアジュバントとして用いた群で、IL-4 では rCTB をアジュバントとして用いた群でその産生が認められたが、その産生量は低かった。IFN γ については、OVA による抗原二次刺激のない場合は、ほとんど産生が認められなかったが、抗原二次刺激した場合は、OVA 単独免疫及び両アジュバントそれぞれ同時投与の場合も同程度の産生が認められ、互いに有意差が認められなかった。

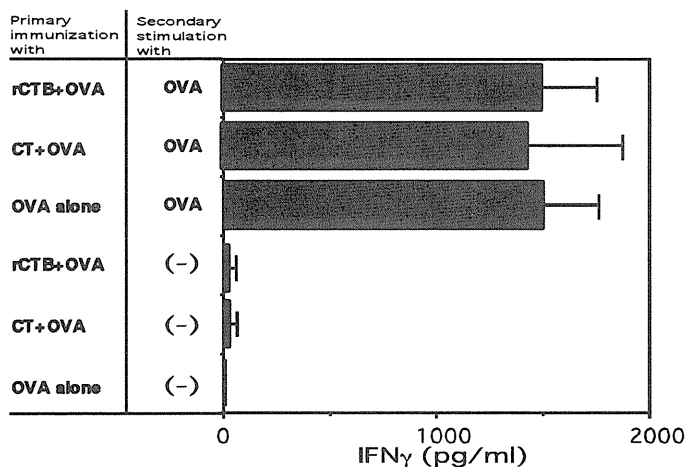


Fig. 2-3. IFN γ production by OVA immunized mouse spleen cells. Spleen cells (5×10^6 cells/ml) were incubated at 37°C for 24 hr with and without OVA (500 μ g/ml) after intranasal co-administration of OVA (50 μ g/mouse) and rCTB (10 μ g/mouse) or CT (1 μ g/mouse). rCTB+OVA, CT+OVA and OVA alone indicate immunization to mouse with OVA plus mucosal adjuvants (rCTB or CT) or OVA alone. OVA indicates the secondary stimulation *in vitro* with OVA. (-) indicates no secondary stimulation *in vitro*. The bars indicate standard deviations.

2-2. DT 免疫マウスの抗体産生と NALT 及び脾臓のサイトカイン産生細胞の解析

DT 単独または DT と rCTB を同時に経鼻免疫したマウスから NALT 及び脾臓細胞を採取し、それぞれのサイトカイン産生細胞数を ELISPOT 法によって測定した。経鼻免疫後 42 日目のマウスの抗原特異血清 IgG 抗体価を Fig. 2-4 に示した。前述の OVA 投与マウスにおけると同様に、DT を単独投与した群に比べ、DT と rCTB を同時投与した群の抗体価が有意に上昇しているのが認められた。これら両群マウスの NALT 細胞を DT によって二次抗原刺激した後、サイトカイン産生細胞数を測定した結果、DT と rCTB 同時投与群において IL-6 産生細胞数の顕著な増加が認められた (Fig. 2-5)。しかしながら、その他のサイトカイン (IL-2、IL-4、IL-5、IL-10、及び $\text{INF}\gamma$) 産生細胞に関しては、明確な結果は得られなかった。一方、脾臓細胞では Fig. 2-6 に示したように、IL-4、IL-5 および IL-6 の産生細胞数は DT と rCTB 同時投与群において明らかに増加したが、IL-2、IL-10、および $\text{INF}\gamma$ などの産生細胞に関しては明確な結果は得られなかった。

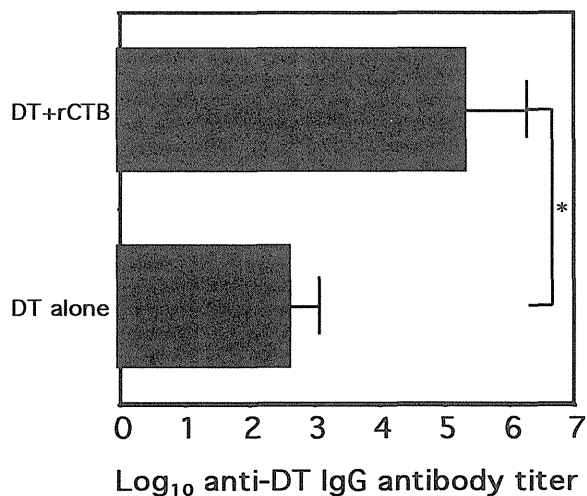


Fig. 2-4. Mouse serum IgG antibody responses to DT. Mice were intranasally co-administered with rCTB (10 μ g/mouse) and DT (5 Lf/mouse). The bars indicate standard deviations. Asterisk indicates statistically significant difference at $P < 0.01$ between DT alone and DT plus rCTB.

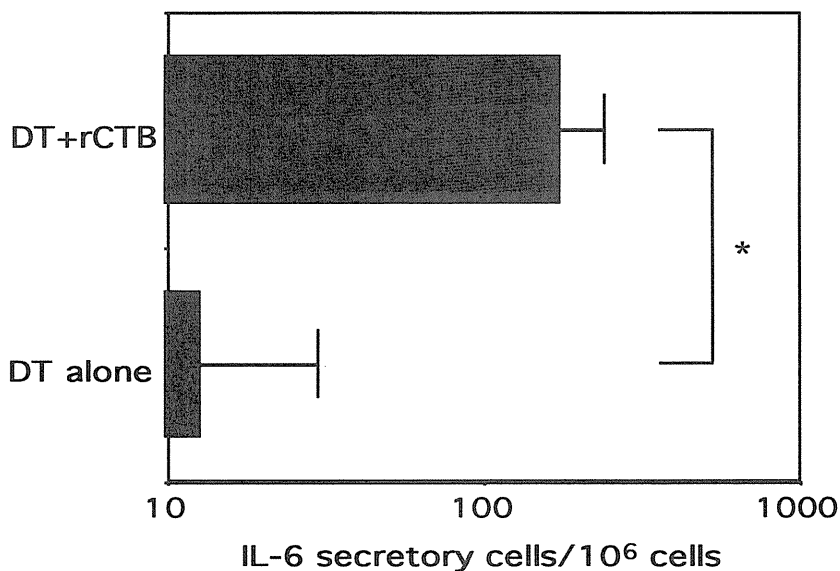


Fig. 2-5. IL-6 secretory cells in mouse NALT cells. NALT cells (10⁶ cells) were incubated at 37°C for 24 hr with DT(1 µg/ml) after intranasal co-administration of DT(5Lf/mouse) and rCTB (10 µg/mouse). The bars indicate standard deviations. Asterisk indicates statistically significant difference at P<0.01 between DT alone and DT plus rCTB.

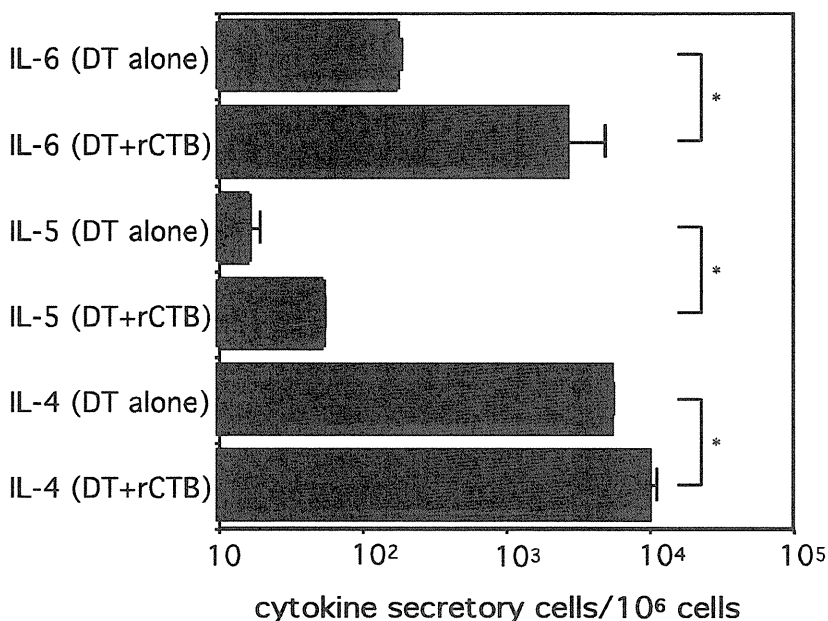


Fig. 2-6. Cytokine secretory cells in mouse spleen cells. Spleen cells (10⁶ cells) were incubated at 37°C for 24 hr with DT(1 µg/ml) after intranasal co-administration of DT(5Lf/mouse) and rCTB (10 µg/mouse). The bars indicate standard deviations. Asterisks indicate statistically significant difference at P<0.01 between DT alone and DT plus rCTB.

考察

rCTB が体液性免疫を増強することはこれまでに明らかにされている (21, 22, 23, 24, 25, 28)。本章では、一次免疫刺激として可溶性抗原を rCTB または CT とともに同時経鼻投与したマウスの脾臓細胞を、同一抗原にて二次刺激し、産生されるサイトカイン量とサイトカイン産生細胞数の変化を検討することにより、rCTB の体液性免疫に及ぼす作用の解析を試みた。

rCTB をアジュバントとして用いた場合、免疫マウスの脾臓細胞を抗原で二次刺激すると、可溶性抗原単独で免疫した場合に比べて IL-2、IL-4、IL-5、および IL-10 の産生の増加が認められた。これらのうち、IL-5 は CT をアジュバントとして用いた場合に比べて産生が有意に上昇したが、脾臓細胞のサイトカイン産生に対する rCTB と CT の影響は類似した傾向を示すと考えられた。IL-4、IL-5、IL-10 は粘膜免疫機構における IgA の産生に重要な役割をもつ (44, 45, 46, 47, 48) ため、rCTB がこれらのサイトカインの産生を誘導することを示した本実験結果は、rCTB の粘膜アジュバントとしての作用を解明する上で興味深いものである。上述のように、rCTB は脾臓細胞に対して IL-2 の産生も誘導した。IL-2 は Th1 細胞によって産生され、主に細胞性免疫に関与すると言われているが、一方で、IL-2 は transforming growth factor- β (TGF- β) による IgA へのスイッチングに関与するという報告もある (49, 50, 51)。また、脾臓には種々の細胞が存在し、ナイーブ T 細胞 (52, 53) や Th0 細胞 (54) などいくつかの種類の細胞は IL-2 を産生するため、rCTB による IL-2 産生がどの細胞によるものか詳細に検討する必要がある。一方、IFN γ では、アジュバントの有無にかかわらず、抗原二次刺激によって同程度産生され、アジュバントの影響は認められなかった。従来、粘膜免疫には Th2 型の免疫機構が主に働くとされているが、これらのことを考慮に入れると、rCTB による粘膜アジュバントとしての作用は、サイトカイン産生の様相から示される Th1/Th2 バランスへの影響のみから必ずしも考える必要はなく、それ以外の機構によっても粘膜免疫応答を増強させている可能

性も否定できない。

本章で得られた実験結果では、rCTB と CT との間に粘膜アジュバントとしての作用に明らかな相違は見出せなかった。両者を粘膜アジュバントとして可溶性抗原とともに経鼻投与した場合、IL-2 を産生させる作用があるものの、IL-4、IL-5、IL-10 の産生がより上昇して Th2 優勢となり、結果として Th2 型の体液性免疫応答を増強するものと考えられる。rCTB の Th1 型細胞性免疫への関与については第三章で検討する。

第三章 組換えコレラ毒素 B サブユニット (rCTB) の細胞性免疫応答における粘膜アジュバント作用

筆者らはこれまでに、rCTB を粘膜アジュバントとして用いた HBs ワクチンの経鼻投与実験を行い、その結果、rCTB が Th2 型の体液性免疫応答におけると同程度に、Th1 型の細胞性免疫応答も増強することを見出した (23)。そこで本章では、細胞性免疫応答が中心となるワクチンである *Mycobacterium bovis*-bacillus Calmette-Guérin (BCG) を用い、遅延型過敏症反応 (DTH) の強度を測定することにより、rCTB の細胞性免疫応答における粘膜アジュバント作用を検討した。

3-1. モルモットにおける rCTB の細胞性免疫増強作用

3-1-1. BCG 経鼻免疫条件の検討

rCTB の細胞性免疫における作用を検討するにあたり、まず、BCG の経鼻免疫条件と、精製ツベルクリン (PPD) により DTH の強度を測定する適当な条件を検討した。DTH の強度測定は皮膚反応により以下のように行った。経鼻免疫モルモットに 0.05 μ g、0.1 μ g、0.2 μ g の PPD をそれぞれ 0.1 ml 溶液として皮内注射し、24 時間後に硬結の直径を測定して統計学的解析を行った。negative control には非免疫モルモットを、positive control には 10^5 colony-forming unit (CFU) の BCG を皮下投与したモルモットを用いて上記と同様に硬結の直径を測定した。BCG の投与量においては、 $10^6 \sim 10^7$ CFU の BCG の 50 μ l 懸濁液を単独で、またはそれに rCTB (20 μ g) を添加した 50 μ l 懸濁液を経鼻投与した。Fig.3-1 に示したように、これらを経鼻投与した場合には、いずれも positive control と同等の強い DTH が認められた。次に、 10^5 CFU の BCG を 20 \sim 200 μ l の懸濁液として経鼻投与し、投与液量の影響を調べた。その結果、20 \sim 100 μ l の懸濁液を経鼻投与したモルモットでは明らかな DTH は観察されなかったが、200 μ l の懸濁液を経鼻投与した場合に

は、positive control と同程度の DTH が観察された (Fig. 3-2)。以上の結果から、rCTB の粘膜アジュバント作用を検討するためには、BCG 単独の経鼻投与では明瞭な DTH を生じない投与量である 10^5 CFU の BCG を 50 μ l または 100 μ l の懸濁液として使用することとした。

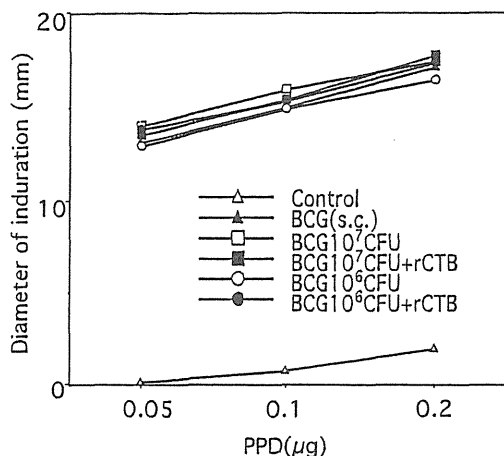


Fig. 3-1. Effects of rCTB on guinea pig skin reaction to PPD.

Guinea pig (n=5) skin reaction to PPD (0.05, 0.1, 0.2 μ g) was performed 6 weeks after intranasal (i.n.) BCG inoculation (10^6 , and 10^7 CFU) with and without 20 μ g rCTB in 50 μ l of saline, as indicated by induration diameter. Control means non-treatment of guinea pigs as negative control for skin reaction. Positive control for skin reaction : subcutaneous (s.c.) administration of BCG.

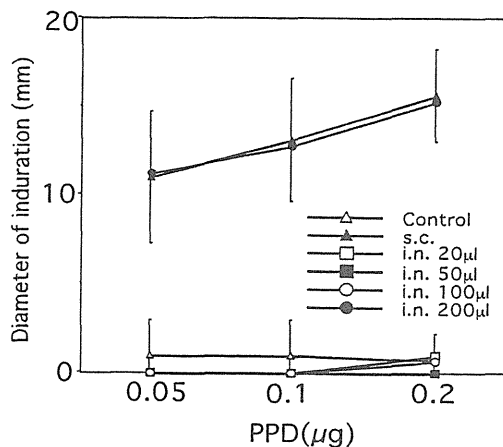


Fig. 3-2. Effects of administered volume on guinea pig skin reaction. Guinea pig (n=5) skin reaction to PPD (0.05, 0.1, 0.2 μ g) was performed 6 weeks after intranasal (i.n.) BCG inoculation (10^5 CFU) in 20-200 μ l of saline, as indicated by induration diameter. Control means non-treatment of guinea pigs as negative control for skin reaction. Positive control for skin reaction : subcutaneous (s.c.) administration of BCG.

10⁵ CFU の BCG に 20 μg の rCTB を添加した 50μl の懸濁液を経鼻投与した群では明らかな DTH を示し、特に 0.2 μg の PPD で皮膚反応を行った場合の硬結の直径は 8.7±4.9 mm であり、同量の BCG を単独で経鼻投与した群との間に 5 % の危険率で有意差が認められた (Fig. 3-3)。

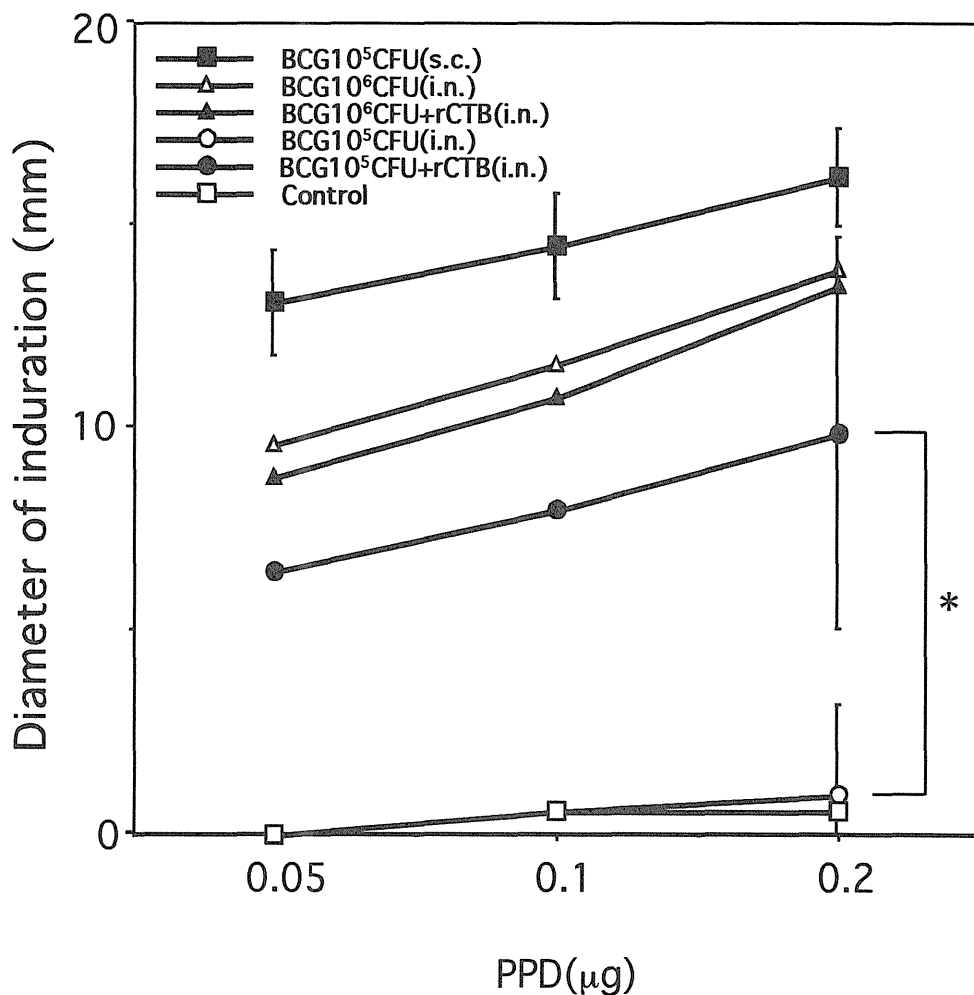


Fig. 3-3. Effects of rCTB on guinea pig skin reaction. Guinea pig (n=5) skin reaction to PPD (0.05, 0.1, 0.2 μg) were performed 6 weeks after intranasal (i.n.) BCG inoculation with and without 20 μg rCTB in 50 μl of saline, as indicated by induration diameter. Control means non-treatment of guinea pigs as negative control for skin reaction. Positive control for skin reaction : subcutaneous (s.c.) administration of BCG. Asterisk indicates statistically significant difference at $P < 0.05$ between BCG (10⁵ CFU) alone and BCG (10⁵ CFU) + rCTB (20 μg).

BCG と同時投与した rCTB の量の影響について検討した結果 (Fig. 3-4)、50 μg と 150 μg の rCTB を同時経鼻投与した群では、投与量に応じて硬結の直径の平均値は上昇したが、rCTB の投与量との間に統計学的有意差は認められなかった。また、図には示してい

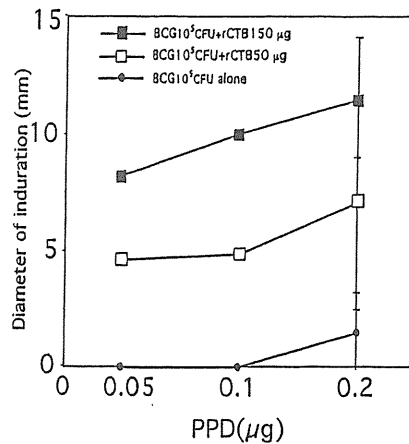


Fig. 3-4. Effects of dose of rCTB on guinea pig skin reaction to PPD. Guinea pig ($n=5$) skin reaction to PPD (0.05, 0.1, 0.2 μg) was performed 6 weeks after intranasal (i.n.) BCG inoculation (10^5 CFU) with 50 and 150 μg rCTB in 50 μl of saline, as indicated by induration diameter.

ないが、10 μg 以下の rCTB との同時経鼻投与群では DTH の直径は negative control 群のそれに比べて差が認められなかった。したがって、以後の実験には 20 または 50 μg の rCTB を粘膜アジュバントとして用いることとした。

次に、BCG で経鼻免疫したモルモットにおいて、rCTB の単独追加経鼻投与が DTH に及ぼす影響について検討した。初回投与として 10^5 CFU BCG 100 μl を 50 μg の rCTB とともに経鼻投与し、その後 2、3、4 週目に 50 μg の rCTB を単独で追加経鼻投与した群では、positive control と同程度の DTH が認められた (Fig.3-5)。この rCTB 追加投与群と、初回投与に 10^5 CFU BCG 100 μl を単独で経鼻投与した群の間での DTH における硬結の直径には 1% の危険率で有意差が認められた。 10^5 CFU BCG 100 μl と rCTB 50 μg を初回に経鼻投与し、rCTB の追加経鼻投与を行わなかった群では DTH における硬結の直径は分散が大きく、他の投与群との比較は困難であった。

また、BCG ではなく PPD 20 μg を初回に単独経鼻投与した群、PPD 20 μg と rCTB 50 μg を同時経鼻投与した群では、rCTB の追加経鼻投与後においても明瞭な DTH は認められなかった。

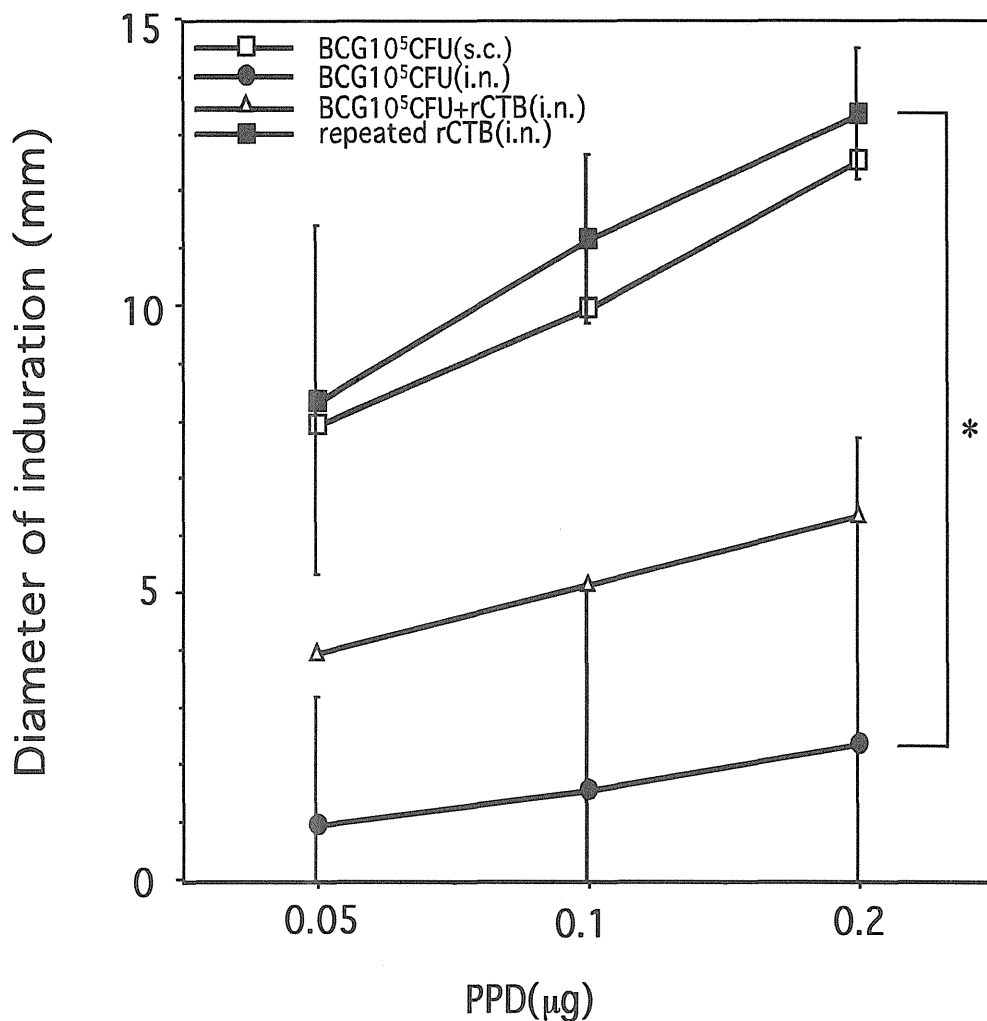


Fig. 3-5. Effects of repeated intranasal administrations of rCTB following primary immunization on guinea pig skin reaction to PPD. Guinea pigs (n=5) were administered 50 μg of rCTB alone in 100 μl of saline on days 14, 21 and 28 following primary immunization (BCG 10⁵ CFU with and without 50 μg rCTB in 100 μl) and intradermally inoculated with PPD (0.05, 0.1, 0.2 μg) on the 35th day. Positive control for skin reaction : s.c. administration of BCG. Asterisk indicates statistically significant difference at P<0.01 between BCG (10⁵ CFU) alone and repeated rCTB administration (50 μg) following primary immunization.

3-1-3. 脾臓細胞の *in vitro* における PPD 刺激に対する反応

BCG との同時経鼻投与における rCTB の作用を細胞レベルで検討するため、BCG 単独で、または BCG と rCTB で同時に経鼻免疫したモルモットの脾臓細胞を採取し、*in vitro* での PPD 刺激に対する PPD 特異的細胞増殖と TNF- α の産生を調べた。 [3 H]チミジンの取り込みによって測定した PPD 特異的細胞増殖 (Fig.3-6) は、 10^6 CFU BCG の経鼻投与群では rCTB ($20\text{ }\mu\text{g}$) の同時経鼻投与の有無にかかわらず positive control とほぼ同じで、前述の皮膚反応において得られた結果と同様であった。一方、 10^5 CFU BCG を経鼻投与した場合には、BCG の単独経鼻投与群での PPD 特異的細胞増殖が negative control と同程度であったのに対し、BCG と rCTB の同時経鼻投与群でのそれは顕著に上昇した。

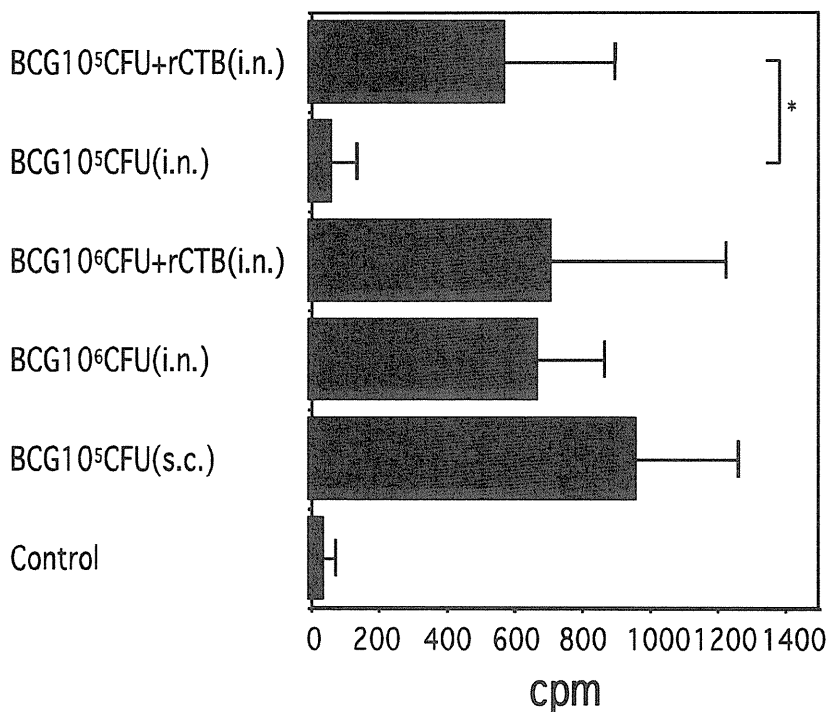


Fig. 3-6. Proliferation of guinea pig spleen cells stimulated with PPD. Guinea pig (n=5) spleen cells (5×10^6 cells) were stimulated with PPD ($10\text{ }\mu\text{g/ml}$) after intranasal BCG inoculation with and without rCTB. Asterisk indicates statistically significant difference at $P < 0.01$ between BCG (10^5 CFU) alone and BCG (10^5 CFU) + rCTB ($20\text{ }\mu\text{g}$).

また、PPD 刺激による脾臓細胞からの TNF- α 産生 (Fig. 3-7) においても、BCG と rCTB の同時経鼻投与群と BCG 単独経鼻投与群の間に有意差が認められた。

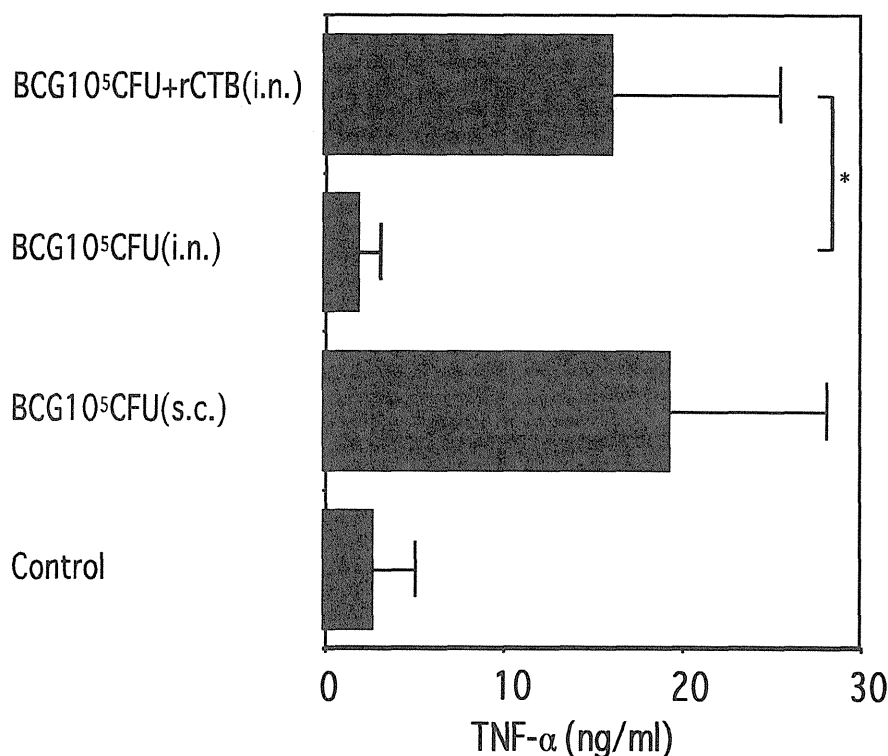


Fig. 3-7. Effect of rCTB on TNF- α production by guinea pig spleen cells stimulated with PPD. Guinea pig (n=5) spleen cells (5×10^6 cells) were stimulated with PPD (10 μ g/ml) after intranasal BCG inoculation with and without rCTB. Asterisk indicates statistically significant difference at $P < 0.05$ between BCG (10^5 CFU) alone and BCG (10^5 CFU) + rCTB (20 μ g).

3-2. マウスにおける rCTB の細胞性免疫増強作用

3-2-1. DTH の足蹠反応による検討

マウスにおける rCTB の細胞性免疫への影響を、DTH の足蹠反応として検討した。マウスの系統は ICR、BALB/c および C57BL/6 を用い、まず、モルモットの場合と同様に経鼻免疫の条件を検討した。その結果、いずれの系統のマウスもモルモットに比べて BCG に対する反応性が低く、 10^6 CFU

以下の BCG (20 μ l) 単独での経鼻免疫では明瞭な DTH は認められず、 10^7 BCG を経鼻免疫した場合に、 10^6 BCG を皮下投与 (positive control) した時と同等の足蹠反応 (FPR) を示した。C57BL/6 マウスを用いた場合、 10^6 CFU BCG と 10 μ g rCTB(20 μ l) を同時経鼻投与した群と 10^6 CFU BCG 単独経鼻投与群での FPR 間に有意差が認められた (Fig. 3-8)。一方、ICR と BALB/c マウスでは上記二つの経鼻投与群での FPR は、C57BL/6 マウスを用いた場合と同様の傾向を示したものの、両投与群の間に統計学的有意差は認められなかった。

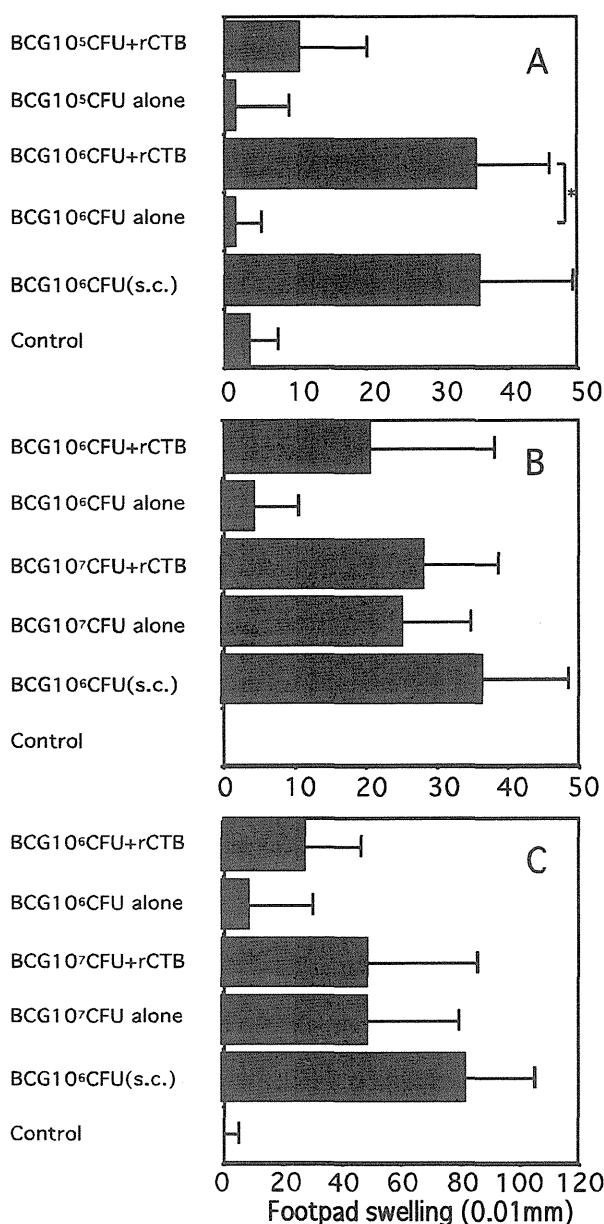


Fig. 3-8. Effects of rCTB on mouse FPR to PPD. C57BL/6(A), BALB/c(B) and ICR(C) mouse (n=10) FPR to PPD (10 μ g) was performed 6 weeks after intranasal BCG inoculation (10^5 , 10^6 and 10^7 CFU) with and without 10 μ g rCTB in 20 μ l of saline. Asterisk indicates statistically significant difference at $P < 0.05$ between BCG (10^6 CFU) alone and BCG (10^6 CFU) + rCTB (20 μ g).

3-2-2. 脾臓細胞の *in vitro* における PPD 刺激に対する反応

10⁶CFU BCG を単独で、または rCTB と同時に経鼻投与したマウスの脾臓細胞を採取し、*in vitro* での PPD 刺激によるサイトカインの産生を検討した。マウスの系統は、FPR において rCTB 同時投与の有無の影響が顕著に現れた C57BL/6 と、顕著には現れなかった BALB/c の両系統を用いた。C57BL/6 と BALB/c 両系統マウスの rCTB 同時経鼻投与群の脾臓細胞では、rCTB を同時投与しなかった群および無処理群のマウス脾臓細胞に比べ、IFN γ の産生が顕著に上昇し、有意差が見られた (Fig. 3-9)。

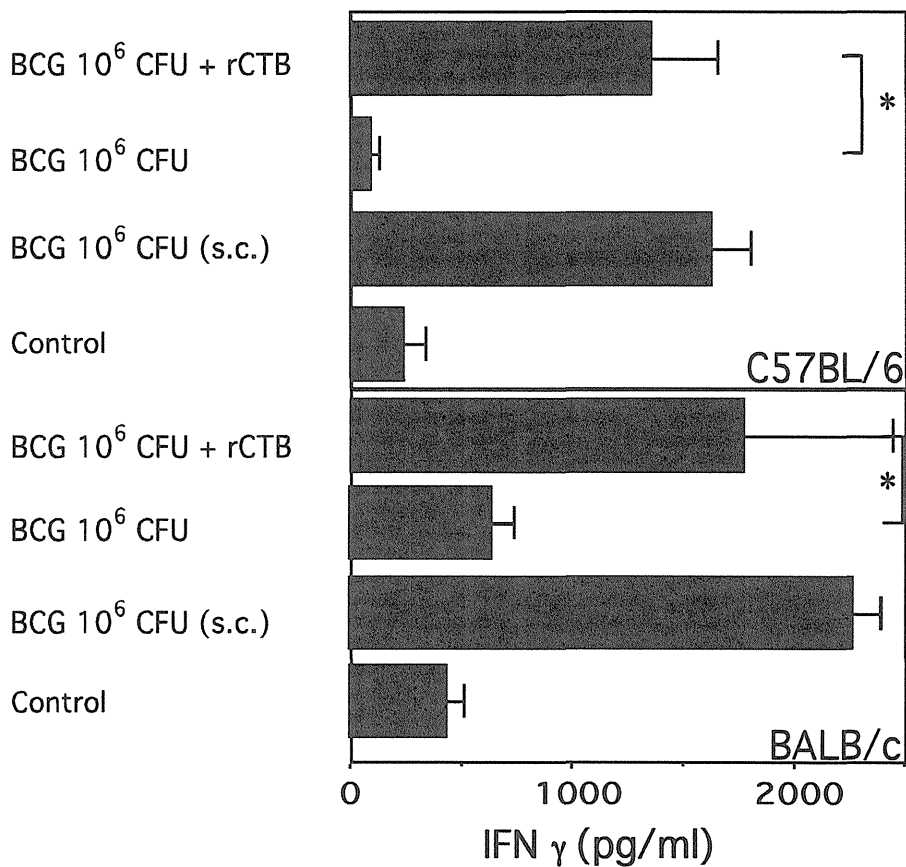


Fig. 3-9. Effects of rCTB on IFN γ production by BCG-immunized mouse spleen cells. C57BL/6 and BALB/c mouse spleen cells were stimulated with PPD (10 μ g/ml) after intranasal BCG inoculation with and without rCTB. Asterisks indicate statistically significant difference at $P < 0.05$ between BCG (10⁶ CFU) alone and BCG (10⁶ CFU) + rCTB (20 μ g).

C57BL/6 マウスの脾臓細胞では、rCTB 同時経鼻投与の有無にかかわらず、IL-4、IL-5、IL-13、IL-18 の産生は確認されなかった。一方、BALB/c マウスの rCTB 同時経鼻投与群の脾臓細胞では、IL-4 と IL-18 の産生は確認されなかったが、C57BL/6 マウスの場合と異なり、IL-5 と IL-13 の産生は有意に上昇した (Fig. 3-10)。

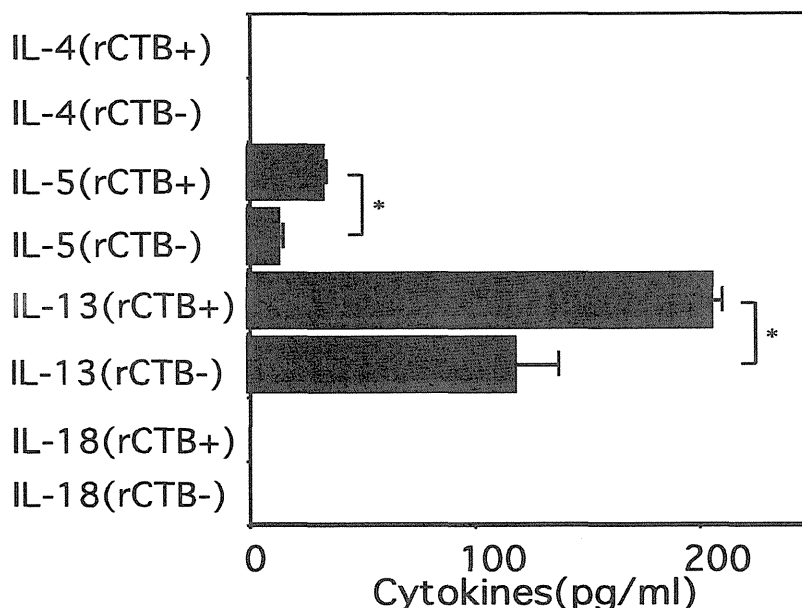


Fig. 3-10. Effects of rCTB on cytokine production by BCG-immunized BALB/c mouse spleen cells. BALB/c mouse spleen cells were stimulated with PPD (10 μ g/ml) after intranasal BCG inoculation with and without rCTB. Asterisks indicate statistically significant difference at $P < 0.01$ between (rCTB+) and (rCTB-).

考察

本章の冒頭で述べたごとく、rCTB と HBs ワクチンとの同時投与実験の結果から、rCTB は、体液性免疫のみならず、Th1 型の細胞性免疫に対してもアジュバント効果をもたらすことが示唆された (23)。従来、CTB の細胞性免疫に対するアジュバント作用についての報告は全くなされていない。このため本章では、細胞性免疫応答を惹起する典型的ワクチンである BCG を用い、rCTB との同時経鼻投与の影響を調べた。

BCG は結核菌感染に対する細胞性免疫応答を成立させ、その免疫応答の強度は PPD を用いた特異的 DTH であるツベルクリン反応によって測定することが出来る。DTH の強度は PPD 接種後の皮膚反応として測定されるが、実験に使用したモルモットでは、ヒトの場合と同様に、明瞭で鋭敏な反応を示し、データの統計的解析が容易であった。マウスでは FPR によって DTH の強度を測定することができた。また、マウスでは生体反応解析のためのツールが多く、本研究で実験系が確立すれば、今後のアジュバント作用機構の解析に有利であると考えられた。BCG を粘膜投与した報告が少ないため (55, 56)、まず、BCG および rCTB の経鼻投与方法について検討し、rCTB のアジュバント作用を明瞭に発現させることが出来る BCG と rCTB の投与量、投与容量を決定した。

第一章と二章で述べたように、可溶性抗原との同時経鼻投与において、rCTB は CT と同様なメカニズムにより、主に Th2 型の体液性免疫機構を増強すると考えられた。したがって、BCG などの細胞性免疫応答を誘導する抗原とこれらを同時投与した場合には、逆に、PPD による DTH や二次抗原刺激による脾臓細胞からの IFN γ 産生などは抑制されると予想した。しかしながら、モルモットへの BCG と rCTB の同時経鼻投与では、BCG の単独経鼻投与に比べて明らかな DTH 増強作用が認められ、また、二次抗原刺激した脾臓細胞からの TNF- α の産生も増強され、rCTB が細胞性免疫応答においてアジュバント作用を現すことを示唆している。さらに、BCG 免疫モルモットにおいて rCTB 単独での二次刺激により DTH の発現が増強され、細胞性免疫の成立した後は rCTB 単独の作用によりそれを増強しうることが明らかとなった。一方、初回の免疫時に BCG を用いずに、可溶性タンパク質抗原である PPD 単独または PPD 及び rCTB の同時投与を行った場合、後に rCTB の単独追加投与を行っても PPD に対する明確な DTH 反応は得られなかった。このことから、rCTB が細胞性免疫を増強するためには、それを誘導する最初の刺激が必要であると考えられ、体液性免疫を増強するか、細胞性免疫を増強するかは、用いた抗原に依存すると考えられる。

マウスを用いた BCG と rCTB の同時経鼻投与実験では、マウスの系統の違いにより免疫応答に差が認められた。C57BL/6 マウスにおいては、BCG と rCTB の同時経鼻投与群と BCG 単独投与群の間で FPR に有意差が認められたが、ICR と BALB/c マウスでは両投与群の間に明瞭な差は認められなかった。これはおそらく各系マウスでの遺伝的相違や遺伝的均一性に由来するものと考えられる (57, 58, 59)。BCG と rCTB を同時に経鼻投与した C57BL/6 と BALB/c マウスでは、PPD による二次抗原刺激によって脾臓細胞からの IFN γ 産生は上昇した。IFN γ は Th1 細胞が産生し、細胞性免疫の活性化にかかわるサイトカインであり (38)、マウスにおいても BCG の経鼻投与による細胞性免疫応答に rCTB がアジュバント効果を発揮したことが示された。一方で、BALB/c マウスでは脾臓細胞の二次抗原刺激により Th2 系のサイトカインである IL-5 と IL-13 の産生増強も確認され、この系統のマウスでは rCTB の同時経鼻投与に対して Th2 型の免疫機構が優位に反応したと思われる。

本章では、細胞性免疫における rCTB の粘膜アジュバントとしての作用について述べた。本章での研究結果より、rCTB は細胞性免疫機構に対してもアジュバント作用を示すことを初めて明らかにした。

第四章 M ϕ のサイトカイン産生及び mRNA 発現に対する rCTB の影響

第一章では、M ϕ の IL-1 産生に対する rCTB 及び CT の影響を述べたが、本章では、rCTB のアジュバント機構解明の手がかりを得るために、M ϕ のサイトカイン産生に対する rCTB の影響をさらに詳細に検討した。

4-1. LPS 刺激によるサイトカイン産生に対する rCTB の影響

4-1-1. LPS 刺激による IL-1 β 産生に対する影響

最初に、M ϕ を rCTB、CT 及び LPS それぞれ単独で刺激した場合、LPS と rCTB 及び LPS と CT で同時刺激した場合について、72 時間までの IL-1 β の産生の推移を調べた。Fig.4-1A に示したように、rCTB と CT それぞれの単独刺激では、無処理コントロールの場合と同様に、IL-1 β の産生は殆ど認められなかったが、その他の刺激ではいずれも IL-1 β の産生が認められ、24 時間後にはほぼプラトーに達した。rCTB と LPS による同時刺激の場合には、6 時間後から IL-1 β の産生が認められ、24 時間以降でその産生は大幅に増強された。一方、CT と LPS による同時刺激の場合、LPS 単独で刺激した場合と比べて IL-1 β の産生量は 1/2 から 1/3 程度であり、LPS 刺激による IL-1 β 産生に対する CT の抑制作用が認められた。第一章での実験も含め、これまでの実験では、M ϕ の刺激に 1 μ g/ml の LPS を用いたが、さらに低濃度の 100、10、1 および 0.1 ng/ml の LPS を用い、rCTB の IL-1 β 産生増強作用に対する LPS の用量の影響を検討した。その結果 (Fig.4-1B)、濃度 1 ng/ml 以上の LPS 刺激によって IL-1 β の産生が認められるとともに、rCTB との同時刺激によってその産生は明らかに増強された。

次に、M ϕ の細胞内 IL-1 β 産生に対する rCTB の影響を調べた。M ϕ を各刺激物とともに培養した培養液の上清を除去し、培養プレートに付着している M ϕ をハンクス液で洗浄した後、1 mM PMSF 及び 0.05% Triton X-100 を

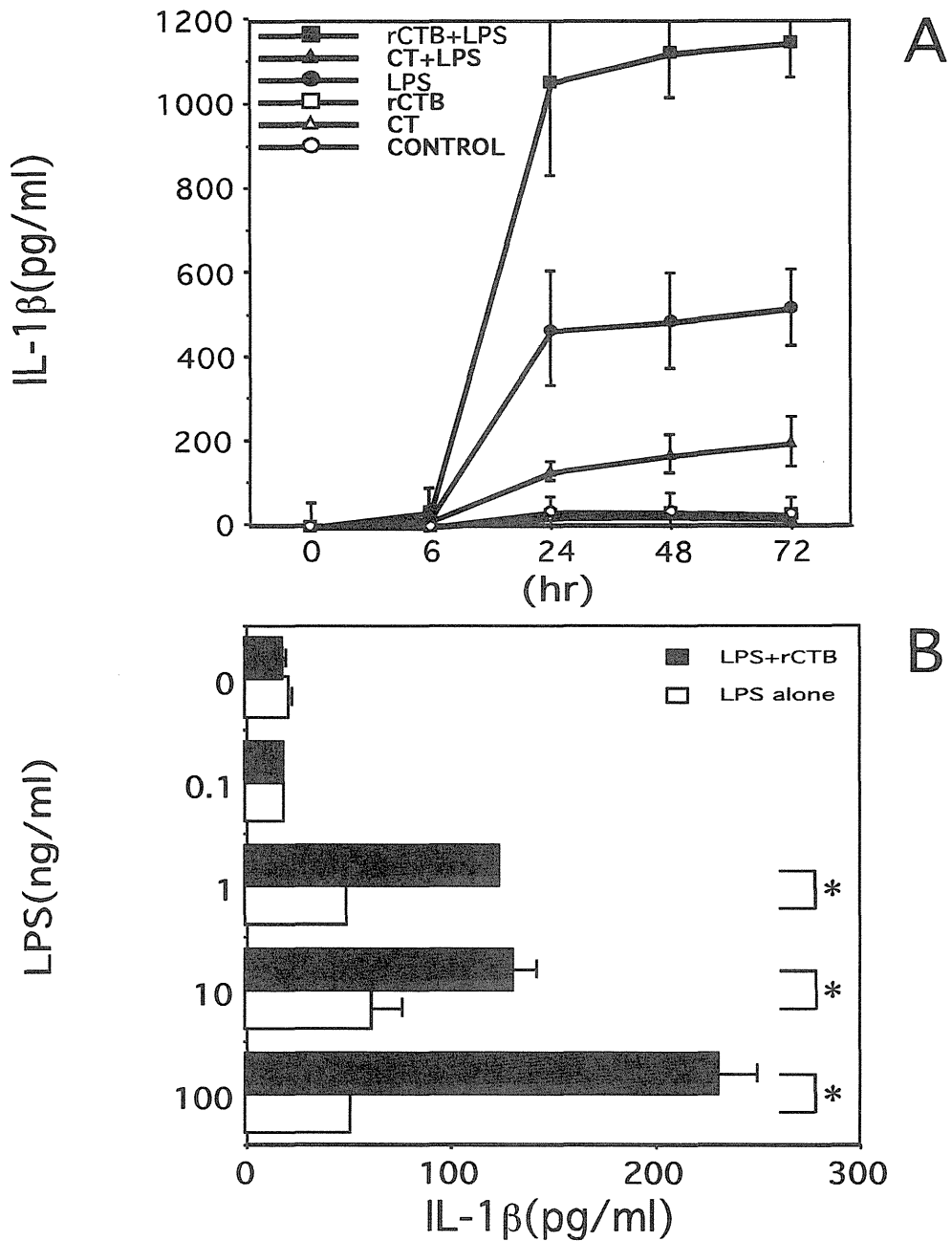


Fig. 4-1. Secretion of IL-1 β by mouse M ϕ . **A:** Effects of rCTB (10 μ g/ml) and CT (1 μ g/ml) on IL-1 β secretion by non-immunized M ϕ (1×10^6 cells) incubated *in vitro* with and without LPS (1 μ g/ml) for 6, 24, 48, and 72 hr at 37°C. Control: non-treated cells. **B:** Effects of rCTB (10 μ g/ml) on IL-1 β secretion by non-immunized M ϕ (1×10^6 cells) incubated *in vitro* with various dose of LPS (0.1 ng/ml to 100 ng/ml) for 24 hr at 37°C. The bars indicate standard deviations. Asterisks indicate statistically significant at $P < 0.01$ by Student's t-test.

含むハanks液で可溶化したものを IL-1 β 測定 of 検体とした。M ϕ of 細胞内には、無処理コントロールにおいても多量 (1275 \pm 601 pg/ml) of IL-1 β が存在していたが、この細胞内 IL-1 β of 量は LPS 単独での刺激よりも LPS と rCTB 同時刺激によって有意に上昇した (Fig.4-2)。すなわち、rCTB は LPS 刺激による M ϕ of 細胞内 IL-1 β 産生にも増強作用を示し、培養液上清で見られたと同様の結果が得られた。

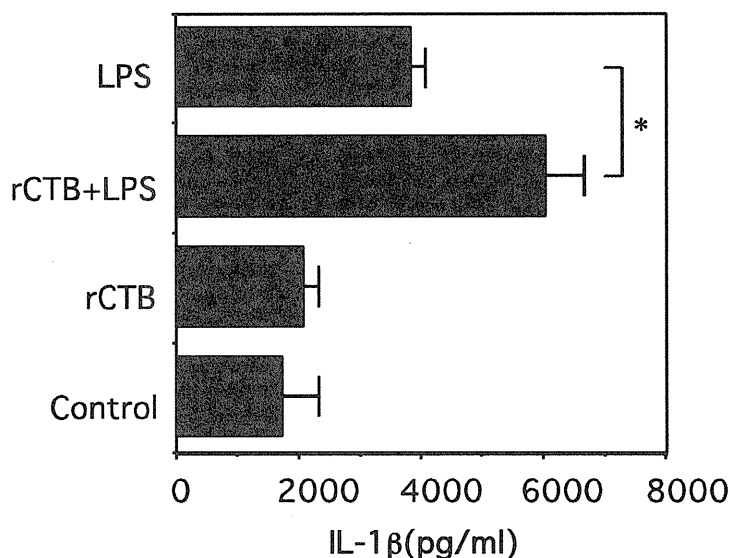


Fig. 4-2. Effect of rCTB on intracellular IL-1 β production by mouse M ϕ . Non-immunized M ϕ (1×10^6 cells) were incubated *in vitro* with and without LPS (1 μ g/ml) for 24 hr at 37°C. The bars indicate standard deviations. Asterisk indicates that the mean value in the presence of rCTB was significantly higher than that in the absence of rCTB (* $P < 0.01$).

以上の結果をさらに遺伝子発現 of レベルで確認するため、M ϕ of での IL-1 β タンパク質合成にかかわる mRNA の発現を調べた。M ϕ of 全 RNA 画分 of ランダムヘキサマーを用いる逆転写反応によって得られた cDNA を PCR によって増幅した。内部標準として β -アクチン合成 of mRNA より得られた cDNA を用いた。各刺激群 of M ϕ より得られた試料に含まれるアクチン of cDNA 量が同一になるように調整して電気泳動を行った結果 (Fig. 4-3)、LPS と rCTB で同時刺激した M ϕ において、IL-1 β of mRNA が強く発現していることが示された。ここで用いた全 RNA 試料にゲノム DNA が混入していな

いことを確認するため、逆転写酵素を加えずに上記と同様の操作を行った検体についても PCR を試みたが、用いたプライマーでの増幅は全く認められなかった。

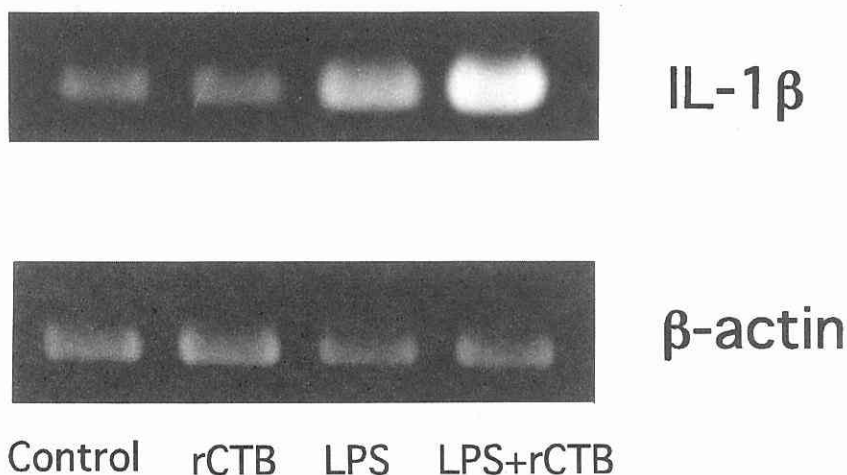


Fig. 4-3. The expression of IL-1 β mRNAs in mouse M ϕ . In all samples, cDNA was synthesized from total RNA, which was extracted from the non-immunized M ϕ (1×10^6 cells) incubated *in vitro* with and without LPS ($1 \mu\text{g/ml}$) and rCTB ($10 \mu\text{g/ml}$) for 24 hr at 37°C . PCR was performed for 25 cycles (IL-1 β) and 20 cycles (β -actin), followed by gel electrophoresis. A fixed amount of β -actin cDNA was used to assess the relative amount of IL-1 β cDNA.

4-1-2. rCTB での M ϕ の前処理の影響

rCTB 単独で M ϕ を前処理した場合に、その後の LPS 刺激による IL-1 β 産生に及ぼす影響を検討した。rCTB 存在下で 24 時間培養した M ϕ を、ハンクス液で洗浄して遊離の rCTB を除去し、新鮮培地を添加してから 0、24、48、72 時間後に LPS を加え、その 24 時間後に上清中に産生される IL-1 β の量を測定した。Fig. 4-4 に示したように、rCTB で前処理した直後に LPS で刺激した M ϕ では、前述の LPS と rCTB での同時刺激の場合と同等の IL-1 β 産生増強が認められ、前処理 24 時間後の LPS 刺激においても同様であった。前処理から LPS 刺激までの時間が 48、72 時間と延長するに従って IL-1 β の産生量は低下し、rCTB での前処理の影響は時間の経過とともに弱まるものの、長時間にわたって残存していることが示された。

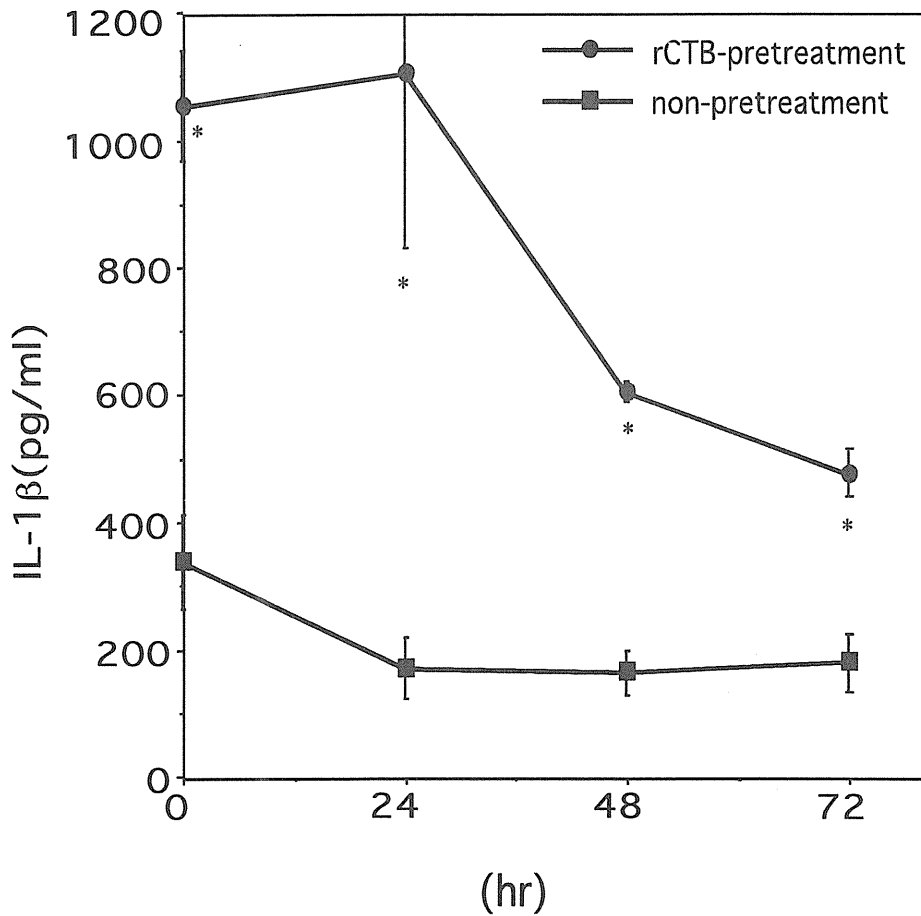


Fig. 4-4. Effect of pretreatment with rCTB on IL-1 β production by mouse M ϕ . After pretreatment of non-immunized mouse M ϕ (1×10^6 cells) with and without rCTB ($10 \mu\text{g/ml}$) for 24hr at 37°C , unbound rCTB was removed by washing with HBSS. The pretreated M ϕ were incubated with medium alone for 0, 24, 48 and 72 hr at 37°C , and then the medium was replaced with fresh medium containing LPS ($1\mu\text{g/ml}$) and further incubated for 24 hr at 37°C . The bars indicate standard deviations. Asterisks indicate that the mean value in the presence of rCTB was significantly higher than that in the absence of rCTB (* $P < 0.01$).

4-1-3. その他のサイトカイン産生に対する影響

第一章で行った実験と同じ条件下において、非免疫マウス M ϕ を LPS 刺激したときのサイトカイン (IL-1 β 、IL-6、IL-10 及び TNF- α) 産生に対する rCTB の影響を検討した。Fig. 4-5A に示したように、1 μ g/ml の LPS で刺激した M ϕ からの IL-1 β 、IL-10 及び TNF- α の産生は rCTB の存在によって有意に増強された。TNF- α は産生量が多く、見かけの増加量は少ないものの統計学的に有意差が認められた。しかしながら、IL-6 は上記濃度の LPS による刺激によって、M ϕ から大量に産生されているため、rCTB の影響を知ることが出来なかった。そこで、より低濃度である 10、1、0.1 ng/ml の LPS を用いて同様に検討した結果、Fig. 4-5B に示したように、1 ng/ml と 10 ng/ml の LPS 刺激の場合、rCTB による IL-6 の産生増強作用が明瞭に認められた。

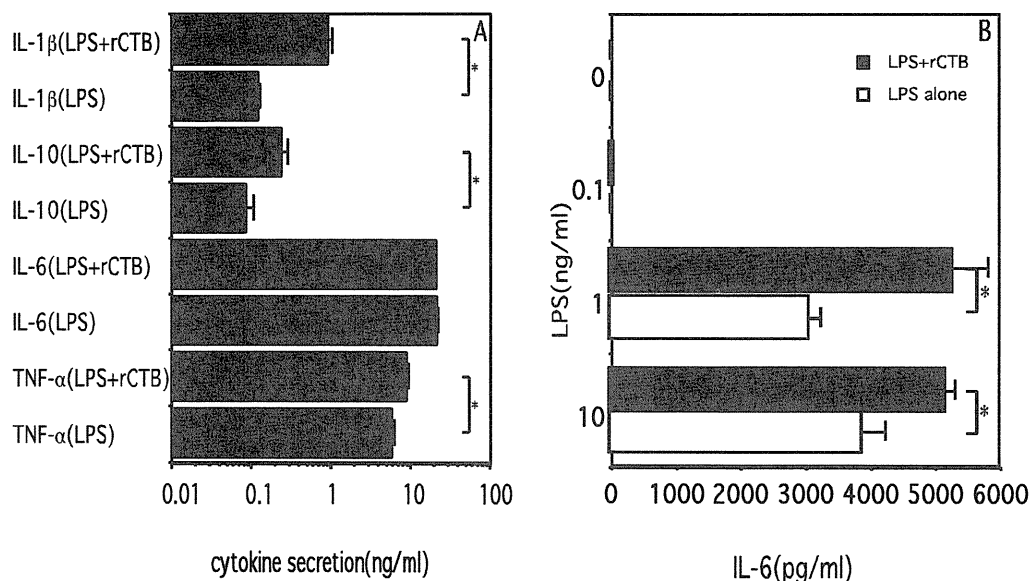


Fig. 4-5. Secretion of cytokine by mouse M ϕ . A: Effect of rCTB (10 μ g/ml) on cytokine secretion by non-immunized M ϕ (1×10^6 cells) incubated *in vitro* with (1 μ g/ml) for 24 hr at 37°C. Control: non-treated cells. B: Effect of rCTB (10 μ g/ml) on IL-6 by non-immunized M ϕ (1×10^6 cells) incubated *in vitro* with various dose of LPS (0.1 ng/ml to 10 ng/ml) for 24 hr at 37°C. The bars indicate standard deviations. Asterisks indicate statistically significant at $P < 0.01$ by Student's t-test.

4-2. LPS 以外の物質での M ϕ 刺激に対する rCTB の影響

4-1 で述べたように、rCTB は LPS で刺激した M ϕ に対し、IL-1 β mRNA の発現を増強させること、また、rCTB 単独での M ϕ の前処理によってもその後の LPS 刺激による IL-1 β 産生が増強されることを明らかにした。これらの事実は、rCTB が M ϕ のサイトカイン産生に至る以前のシグナル伝達機構に作用することによってアジュバント活性を発現することを示唆している。このことを明らかにする目的で、細胞表層の種々のレセプターと結合する物質で刺激した M ϕ に対する rCTB の作用を追究した。微生物由来成分に対するレセプターとしては Toll 様レセプター (TLR) がよく知られており (60, 61)、現在ヒトにおいて 10 種類の TLR が同定されている (60, 62, 63)。4-1 で M ϕ の刺激に用いた LPS のレセプターは TLR4 である (64)。本章では、rCTB が M ϕ の TLR4 あるいはそれ以外の TLR を介するシグナル伝達機構に作用するのか、その他のシグナル伝達機構にも作用するのかを検討した。本実験で用いた M ϕ の刺激物とそれらのレセプターまたはシグナル伝達機構における作用点を表 (Table 4-1) に示した。

4-2-1. サイトカイン産生に対する影響

まず、M ϕ でのサイトカイン産生に対する rCTB の影響を検討した。Fig. 4-6 に示した様に、M ϕ を Taxol、Sansorbin、Pansorbin、および Peptidoglycan それぞれ単独で刺激した場合、LPS 単独刺激の場合と比べて同等またはそれ以上の IL-1 β が産生され、さらに rCTB で同時刺激するといずれの場合も IL-1 β 産生は有意に増強された。TNF- α では rCTB との同時刺激による IL-1 β の産生増強は認められなかった。その他 ionomycin、calcium ionophore A23187、phorbol ester である TPA および IFN γ による M ϕ の刺激では IL-1 β はほとんど産生されず、rCTB との同時刺激によってもその産生は増加しなかった。CpG-DNA もこれらの物質と同様に、高濃度 (100 μ g/ml) での M ϕ 刺激においても IL-1 β の産生は認められなかったが、IL-6 は少量ながら産生

Table 4-1. サイトカイン産生刺激物とレセプター

刺激物	濃度	レセプター及び作用点 (ref.)
LPS	1 µg/ml	TLR4 (64)
Taxol	4 µM	TLR4 (65, 66, 67)
Sansorbin (S:ブドウ球菌死菌体)	0.05%	TLR2
Pansorbin (P:ブドウ球菌死菌体)	0.05%	TLR2
Peptidoglycan (PGN)	100 µg/ml	TLR2 (68, 69)
CpG-DNA	10, 100 µg/ml	TLR9 (70)
TNF-α	25 ng/ml	TNF レセプター
Ionomycin	1 µM	Ca ²⁺ 流入
Calcium ionophore A23187	1 µM	Ca ²⁺ 流入
12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA)	1 µM	protein kinase C
IFNγ	100-2000U/ml	IFNγレセプター

が認められ、rCTB との同時刺激によってその産生は 2～3 倍に増強された (Fig. 4-7)。この IL-6 産生に対する rCTB の増強作用は BALB/c マウス (Fig.4-7 B) のみならず、TLR4 を欠損し LPS 低応答性である C3H/HeJ マウス (Fig. 4-7 A) の Mφにおいても同様に認められ、rCTB は TLR4 以外の TLR にも作用することが明らかとなった。また、CpG-DNA に対してより高い反応性を示す骨髓細胞を用いた場合 (Fig. 4-7 C) では、低濃度 (10 µg/ml) での刺激により IL-1βの産生が認められ、さらに rCTB との同時刺激によってその産生量は大幅に増大し、Mφを LPS と rCTB で同時刺激した場合と同程度の産生量に達した。以上の結果は、rCTB は TLR を介するシグナル伝達機構に作用し、本研究で行った限りでは、他のシグナル伝達機構に対しては影響を及ぼさないことを示すものであった。

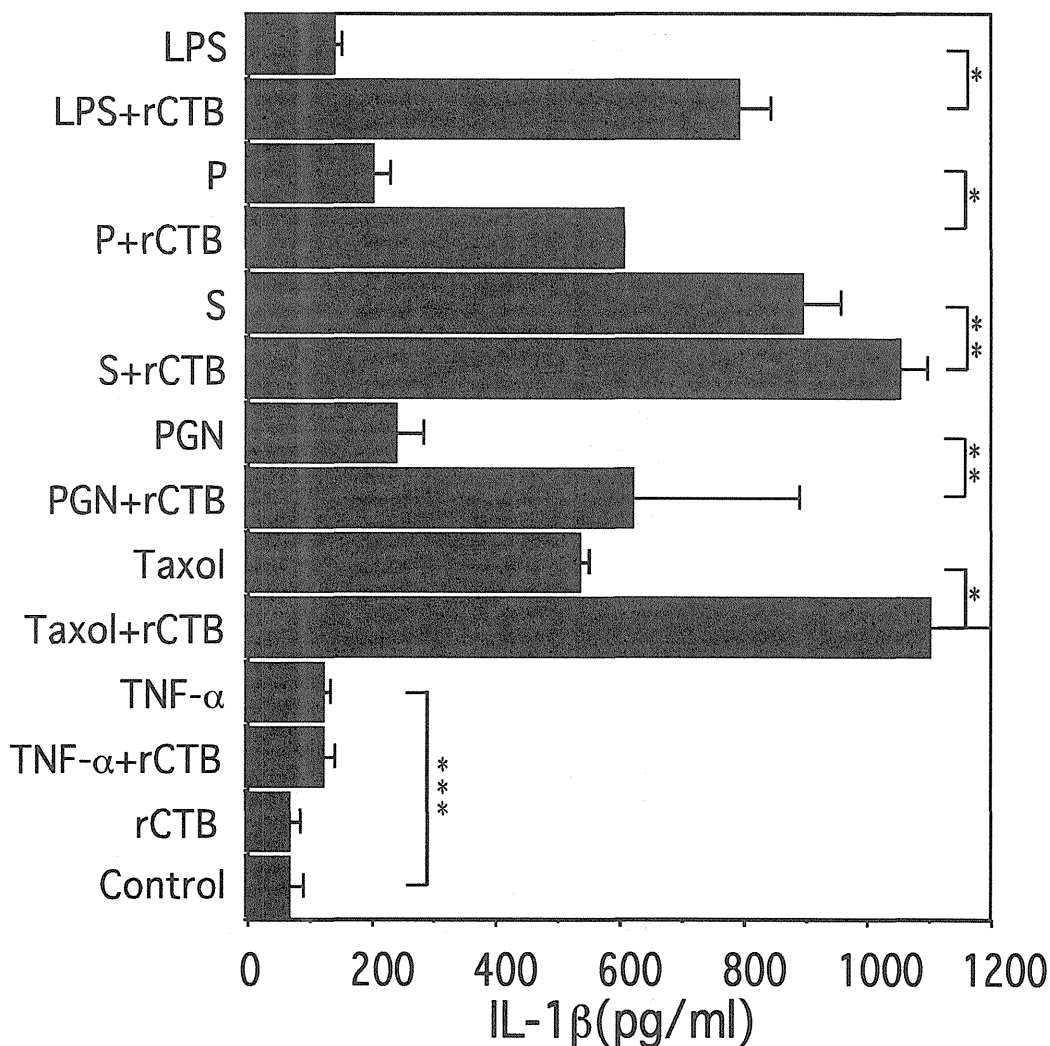


Fig. 4-6. Effect of rCTB on IL-1 β production by mouse M ϕ . Non-immunized M ϕ (1×10^6 cells) were stimulated *in vitro* with 0.05% Sansorbin (S), 0.05% Pansorbin (P), 100 μ g/ml peptidoglycan (PGN), 4 μ M Taxol, 25ng/ml TNF- α and 1 μ g/ml LPS for 24 hr at 37°C. M ϕ were incubated with and without rCTB (10 μ g/ml). The bars indicate standard deviations. Asterisks indicate that the mean value in the presence of rCTB was significantly higher than that in the absence of rCTB (* $P < 0.01$, ** $P < 0.05$) and the mean value in the presence of TNF- α was significantly higher than Control (***) $P < 0.05$).

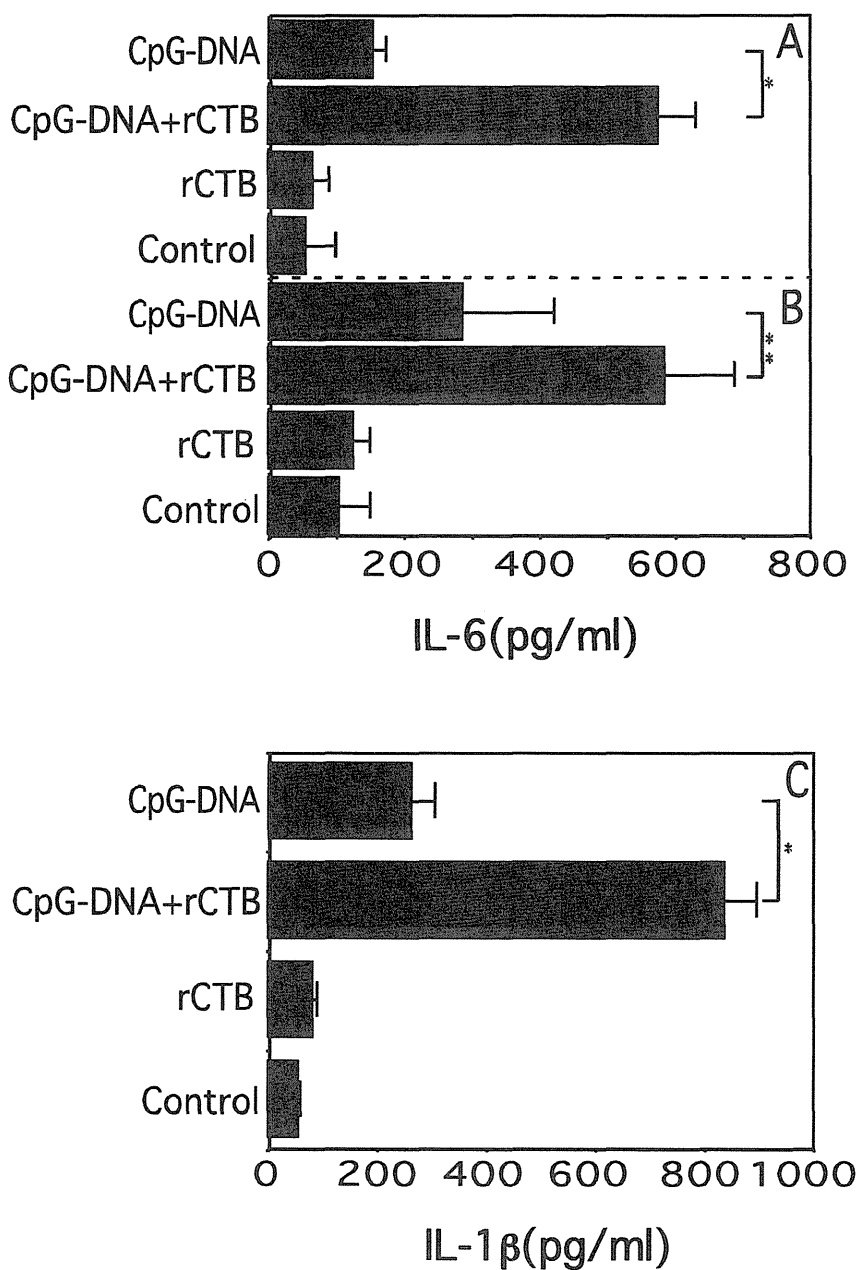


Fig. 4-7. Effect of rCTB on IL-6 and IL-1 β production by mouse M ϕ . Non-immunized M ϕ (A: C3H/HeJ mouse, B: BALB/c mouse, 1×10^6 cells) and bone marrow cell (C: BALB/c mouse, 1×10^6 cells) were stimulated *in vitro* with CpG-DNA (A and B: 100 μ g/ml, C: 10 μ g/ml) for 24 hr at 37°C. The cells were simultaneously incubated with and without rCTB (10 μ g/ml). The bars indicate standard deviations. Asterisks indicate that the mean value in the presence of rCTB was significantly higher than that in the absence of rCTB (* $P < 0.01$, ** $P < 0.05$).

4-2-2. mRNA 発現に対する rCTB の影響

次に、rCTB の TLR 系への作用を mRNA 発現レベルで追及した。M ϕ を rCTB (10 μ g/ml) 存在下で 0、1、3、6、24 時間培養後、RNA を抽出し、MyD88、TLR2、TLR4 の mRNA 発現量を RT-PCR により検討した。MyD88 は TLR 系のアダプター分子であり、TLR からのシグナル伝達経路において上流と下流の二つの分子を物理的に橋渡しすることによりシグナルを伝える分子である (71, 72)。4-1-1 で述べたと同様に β -アクチンを内部標準として電気泳動を行った。その結果、Fig. 4-8 に示したように、MyD88 の mRNA は 3 時間培養 M ϕ で最も強い発現が認められ、6 時間と 24 時間培養 M ϕ においても発現は認められたがその発現量は減少していた。また、TLR2 の mRNA では 1 時間、3 時間および 6 時間培養 M ϕ においてはほぼ同程度の明瞭な発現が認められたが、24 時間培養 M ϕ ではほとんど発現されていなかった。一方、TLR4 の mRNA は rCTB による刺激の有無および刺激時間の長さにかかわらず、一定量が発現されていた。以上の結果から、M ϕ は rCTB の刺激を受けることにより、MyD88 と TLR2 の mRNA を強く発現することが示された。

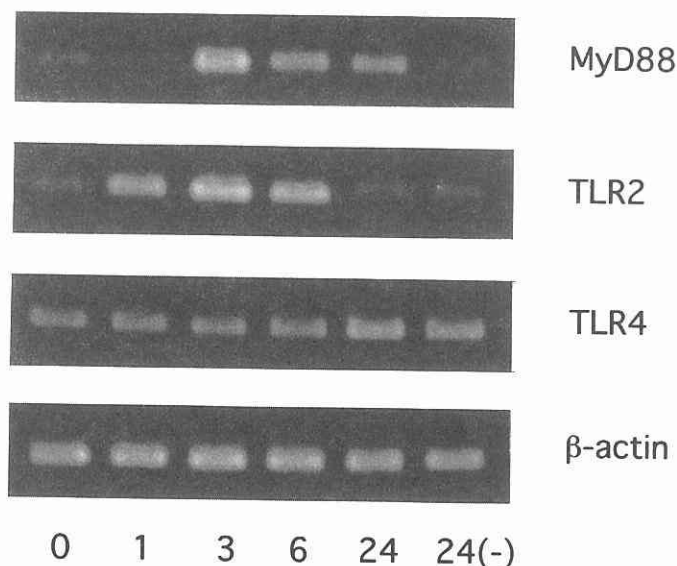


Fig. 4-8. Expression of MyD88, TLR2 and TLR4 mRNAs. cDNA was synthesized from total RNA, which was extracted from the non-immunized mouse M ϕ (1×10^6 cells) incubated *in vitro* with and without rCTB (10 μ g/ml) for 0, 1, 3, 6 and 24 hr at 37°C. (-): without rCTB. PCR was performed for 25 cycles (MyD88), 30 cycles (TLR2) and 25 cycles (TLR4). β -actin (20 cycles) was used as internal standard.

考察

本章では rCTB の M ϕ に対する作用を詳細に検討した。IL-1 β は体液性免疫における抗体産生に深く関与し、そのノックアウトマウスでは抗原特異的抗体産生が低下することが報告されているため (73, 74)、まず、IL-1 β の産生に対する rCTB の影響を詳しく検討した。M ϕ を LPS と rCTB で同時刺激することによって、その培養液中と細胞内の IL-1 β 産生量は大幅に増加するとともに、IL-1 β の合成にかかわる mRNA の発現も増強されていた。さらに、rCTB による M ϕ の前処理後も長時間にわたって LPS の刺激を増強する効果が維持された。したがって、rCTB は LPS のレセプターに刺激を受けてから IL-1 β の mRNA を発現するまでの間のシグナル伝達機構に作用することが強く示唆された。そこで、レセプターまたはシグナル伝達機構への作用点が異なる物質を用いて M ϕ を刺激した時に rCTB の及ぼす影響を検討した。TLR2、TLR4 および TLR9 をそれぞれレセプターとする物質と rCTB による M ϕ の同時刺激において、IL-1 β または IL-6 の産生が増強されることから、rCTB は TLR を介するシグナル伝達機構に作用していることが強く示唆され、このことはさらに、rCTB 処理 M ϕ における MyD88 と TLR2 の mRNA 発現増強によっても支持された。TLR からのシグナルは、例外はあるものの、MyD88 を介する経路が主要な伝達経路であると考えられている (71, 72)。したがって、rCTB は MyD88 の発現量を増加させ、あるいはそれとともにレセプターそのものである TLR2 の発現量を増加させることによって TLR を介したシグナル伝達を増強し、サイトカインの産生を増強させると考えられる。rCTB による M ϕ の刺激では、LPS のレセプターである TLR4 の mRNA の発現増強は認められなかった。しかし、TLR4 は rCTB 非刺激下においても常に一定量発現されており、rCTB はその発現量の増加に対するよりも、MyD88 の発現量を増加させることによりサイトカインの産生を増強させたと考えられる。

以上、本章では rCTB が M ϕ の MyD88 と TLR2 の mRNA 発現を増強する

ことを明らかにした。しかしながら、rCTB が他のシグナル伝達機構にも作用する可能性を否定するものではない。本研究では、主に TLR のアゴニストを Mφ の刺激物として用い、その作用に対する rCTB の作用を検討した。今後さらに、rCTB の TLR 以外のレセプターに対する作用、サイトカインの遊離機構への作用、および rCTB のレセプターである GM1 ガングリオシドと TLR との間の直接的関連の有無などについて検討する必要がある。本研究では主に Mφ に対する rCTB の作用を検討したが、TLR は T 細胞表面にも発現されており (75)、rCTB は TLR を介して T 細胞の機能にも影響を与えている可能性があり、さらに、B 細胞 (76, 77) に対する rCTB の作用も検討すべき課題である。

TLR を介したシグナル伝達機構は、自然免疫系と深くかかわっている (61, 62)。自然免疫系の活性化によるサイトカインの産生は、一方で獲得免疫系の活性化にも影響する (78, 79, 80)。本研究で得られた成績は、rCTB は TLR を介したシグナル伝達機構に作用することにより自然免疫系とともに抗原特異的抗体産生や抗原特異的細胞性免疫などの獲得免疫にも影響を及ぼし、粘膜アジュバントとしての作用を発揮することを強く示唆した。

総括

次世代ワクチンとして期待の寄せられる粘膜ワクチンの開発のためには、安全で免疫増強効果に優れた粘膜アジュバントの開発も必要である。CT が強力な粘膜アジュバント活性を示すことはよく知られており、そのアジュバント活性には ADP リボシル化酵素である CTA の cAMP 産生増強作用が深く関わりとされてきた。CT より分離精製された市販 CTB には微量ながら CT または CTA が混入し、市販 CTB を用いて得られた従来の研究結果は、必ずしも CTB のみの活性を示すとはいえず、CTB そのもののアジュバント活性を知ることは困難であった。遺伝子組換えによってグラム陽性菌に産生させた rCTB は、CT および CTA を含まず、またグラム陰性細菌由来

の生理活性物質である LPS も含まないため、CTB 独自の生理活性解明のためには格好の研究材料である。著者らはすでに、rCTB が毒性を示さず、ワクチンとの経粘膜同時投与において免疫増強作用を有することを明らかにし、その粘膜アジュバントとしての有用性を指摘した。CTA を含まない CTB のアジュバント活性発現機構については、従来検討されたことがなく、その詳細な検討には免疫学的に興味をもたれ、さらに、粘膜免疫機構の解明に重要な示唆を与えるとともに、rCTB をアジュバントとして用いた粘膜ワクチンの開発・改良や、その粘膜への安全且つ効果的投与法の確立などに有用な情報を提供すると考えられる。本研究ではこうした観点から、CTB のアジュバント活性発現機構を解明する目的で rCTB を用い、主に M ϕ に対する作用を詳細に検討した。

第一章では、*in vitro* において M ϕ に対する CT と rCTB の作用の違いを主に検討した。rCTB 単独では CT と異なり、M ϕ に cAMP 及び IL-6 の産生を誘導せず、rCTB は CT とは異なる機構で M ϕ に作用する可能性を示した。さらに、LPS とともに同時刺激した M ϕ においても、rCTB は CT と異なり IL-1 の産生を増強するが、IL-12 の産生に対しては CT と同様に抑制作用を示すことを明らかにした。すなわち、rCTB は CT と同様に Th2 型の免疫応答を増強するが、両者の作用機構には相違があることを示した。

第二章では、OVA または DT とともに rCTB を同時経鼻投与したマウスの脾臓細胞および NALT 細胞について、サイトカイン産生に及ぼす rCTB の影響を検討した。上記免疫マウスでは、体液性免疫が増強され、産生される抗原特異的抗体価は上昇した。これらのマウスから採取した脾臓細胞および NALT 細胞を、抗原で二次刺激したときに産生が増強されるサイトカインの種類と産生量、及びサイトカイン産生細胞数を測定することにより、rCTB は IL-4、IL-5、IL-10 の産生をより強く上昇させることにより Th2 優勢とし、結果として Th2 型の体液性免疫を増強することを示した。

一方で、rCTB は HBs 抗原との同時投与では IgG1 とともに IgG2a の産生も増強することが報告され、また、第二章での実験においても IL-2 と IFN γ

の産生を増強させることが明らかとなり、rCTB は体液性免疫のみならず細胞性免疫応答に対してもアジュバント活性を示すことが示唆された。このため、第三章においては、rCTB の細胞性免疫に対するアジュバント活性を検討した。rCTB と BCG との同時経鼻投与により有意に DTH 反応が増強され、その脾臓細胞を抗原で二次刺激することにより IFN γ の産生が顕著に上昇することなど、rCTB が細胞性免疫に対してアジュバント活性を示すことが明らかにされた。

第四章においては、M ϕ に対する rCTB の作用をより詳細に検討した。rCTB と LPS で同時刺激した M ϕ では IL-1 α/β 、IL-6、IL-10、TNF- α などのサイトカイン産生が大幅に上昇した。LPS と同様に TLR をレセプターとする PG、黄色ブドウ球菌死菌体、Taxol、CpG-DNA などと rCTB での同時刺激によっても同様にサイトカイン産生の増強が認められたが、TLR 以外をレセプターとする刺激物との同時刺激では、サイトカインの産生は認められなかった。また、上記のサイトカイン産生増強は、TLR2 および MyD88 の mRNA の発現を伴うことも明らかとなった。したがって、rCTB は標的細胞上の GM1 ガングリオシドに結合した後、TLR を介するシグナル伝達系に作用してサイトカイン産生を増強すると考えられた。TLR は自然免疫系のシグナル伝達を担っており、rCTB はこの自然免疫系を刺激することにより、同時に投与された抗原の種類に応じて体液性または細胞性免疫の獲得免疫を増強することが強く示唆された。この成績は、GM1 結合性の物質には同様の機構によってアジュバント活性を発現するものが存在することを示唆しており、よりよいアジュバントの発見・開発の一助になると考える。

以上、本研究では rCTB の粘膜アジュバントとしての作用機構の解明を試み、多くの成果が得られた。しかしながら、その作用機構全体の解明には更なる多くの検討が必要である。本研究では主に M ϕ を用いたが、rCTB は T 細胞や B 細胞に対しても作用する可能性は十分にあり、これらの免疫系細胞を刺激することによるアジュバント活性発現も検討する必要がある。また、粘膜アジュバントとして投与される際の投与部位の NALT 細胞や腸

管関連リンパ組織細胞に対する作用も重要である。本研究で得られた成績は、rCTB の粘膜アジュバントとしての有用性を支持するものであるが、今後、実用化にむけては、経鼻、経口、経膈投与などワクチン投与部位に応じた剤型の工夫とともに、それによる rCTB のアジュバント活性への影響も検討課題である。

謝辞

本研究をまとめるにあたり、終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました城西大学薬学部 近藤誠一助教授に衷心より深甚なる謝意を表します。

また、数々の有益な御助言を賜りました城西大学薬学部 一色恭徳助手に心から感謝するとともに、城西大学薬学部病原微生物学講座の諸氏に感謝いたします。

さらに本研究を遂行するにあたり、終始御指導、御鞭撻を賜りました国立感染症研究所血液・安全性研究部室長（現 独立行政法人 医薬品医療機器総合機構 顧問）後藤紀久博士に衷心より深謝いたします。

rCTB 及びワクチン抗原を分与して頂き、また有益な御助言と御指導を賜りました名古屋市立大学医学部 枋久保邦夫名誉教授、安田陽子助教授、井坂雅徳助手、並びに（財）化学及血清療法研究所 大隈邦夫部長に深謝の意を表します。

BCG の実験について御協力頂き、また有益な御助言並びに御指導を賜りました国立感染症研究所細菌第二部室長 山本三郎博士に心から感謝いたします。

本論文の作成にあたり、御校閲と御教示を賜りました 副査 城西大学薬学部 日比野康英教授、副査 城西大学薬学部 夏目秀視助教授に深く感謝いたします。

実験の部

【実験の部】

一般事項

1. rCTB の調製

rCTBは、鵜高ら（18）によって開発された*Bacillus brevis*の外来タンパク質分泌産生を利用し、イナバ型コレラ菌569B株由来のCTB遺伝子を組込んだ*Bacillus brevis* HPD31（pNU212-CTB）株の培養上清をD-ガラクトース/アガロースカラムにより精製したものをを用いた(19)。

2. 実験動物

7週齢の雌 ICR、BALB/c、C57BL/6 または C3H/Hej マウス、及び約 300g の雌 Hartley 系モルモットを日本エスエルシー株式会社より購入した。

3. 抗体価の測定

マウスの尾静脈から採血し、血清を分離した後、ELISA 法によって抗体価を測定した。

3-1. ELISA

抗原溶液として、0.1M 炭酸緩衝液（pH8.2）に溶解した卵白アルブミン（OVA、1 mg/ml）および 0.9%食塩を含むリン酸緩衝液（PBS, pH7.2）に溶解したジフテリアトキソイド（DT：化血研、熊本：1 μ g/ml）を用いた。96 穴プレート（Maxsorp flat-bottom plate、Nunc、Demmark）各ウェルに 50 μ l の抗原溶液を分注し、4 $^{\circ}$ C で 18 時間インキュベートした。抗原溶液を回収し、プレートを PBS で 3 回洗浄し、1%牛血清アルブミン（BSA）を含

む PBS を各ウェルに 100 μ l ずつ分注し、室温で 1 時間ブロッキングした。0.05%Tween20 を含む PBS (PBS-T) で 3 回洗浄し、2 倍希釈系列とした検体 50 μ l を各ウェルに加え、4 $^{\circ}$ C で 18 時間インキュベートした。検体希釈用 buffer は 0.1%BSA を含む PBS を用いた。インキュベート後、PBS-T で 3 回洗浄し、2000 倍希釈した 2 次抗体 (50 μ l) を加えて、室温で 2 時間インキュベートした。2 次抗体は、西洋わさびペルオキシダーゼ標識ヤギ抗マウス IgG 抗体 (Zymed, Calif., USA) を用いた。ついで、PBS-T で 6 回洗浄し、各ウェルに発色剤溶液 (100 μ l) を加えて室温で 10~30 分反応させた。発色剤溶液は用時調製とし、*o*-phenylenediamine dihydrochloride tablet を 0.5 mg/ml となるように 0.1Mクエン酸ーリン酸緩衝液 (pH5.0) で溶解し、30% 過酸化水素水を 10 μ l 加えた溶液を調製し直ちに各ウェルに加えた。反応は 1M 希硫酸 (100 μ l) を添加して停止させ混合した後、プレートリーダー (Organon Teknika, Austria) を用いて吸光度を測定し、492nm における吸光度がバックグラウンドと同等になる希釈倍率を抗体価とした。

4. 脾臓細胞の調製及び培養

免疫した動物 (マウスまたはモルモット) を麻酔剤過剰投与により安楽殺し、脾臓を摘出した。脾臓をシャーレ上で 5 ml の RPMI-1640 培地 (日水製薬、東京) を用いて、歯科用ピンセットによって細胞を押しだして分散させ、ナイロンメッシュでろ過して細胞浮遊液を得た。脾臓細胞を 500 \times g、5 分間冷却遠心分離し、10 ml の RPMI-1640 培地を用いて同様の遠心分離により 3 回洗浄した。洗浄後の脾臓細胞は、10 ml の 10%牛胎児血清を含む RPMI-1640 培地 (FCS-RPMI) に再浮遊させ、血球計数盤にて、各個体ごとに細胞数を計測した。得られた脾臓細胞浮遊液は、FCS-RPMI を添加することにより 1×10^7 cells/ml に調整した。この脾臓細胞浮遊液を 1 ml または 500 μ l ずつ 24 ウェル培養プレート (FALCON^R, Becton Dickinson Co., NJ., USA) に分注し、抗原その他の細胞刺激物を加えて、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ で 24

時間培養した。培養後、プレートを $500\times g$ 、10 分間冷却遠心分離することによって上清を採取し、 -80°C に保存した。

5. マウスマクロファージの調製及び培養

マウスの腹腔内に 4.05%Brewer のチオグリコレート培地 (Difco Laboratories, Detroit, Mich., USA) を 2 ml 投与し、4 日後、注射器を用いて 3 ml のハンクス液 (HBSS) またはダルベッコのリン酸緩衝液 (D-PBS) で 3 回洗浄し、洗浄液を腹腔滲出細胞浮遊液として用いた。腹腔滲出細胞は、10 ml の HBSS または D-PBS を用い、 $500\times g$ 、10 分間の冷却遠心分離によって、3 回洗浄した。洗浄後の細胞は、10 ml の FCS-RPMI に再浮遊させ、血球計数盤にて細胞数を計測した。計数後、再度遠心分離し FCS-RPMI を加え $2\times 10^6\text{cells/ml}$ に調整した。得られた細胞浮遊液を、1 ml ずつ 24 ウェル培養プレートに分注し、 37°C 、5% CO_2 で 2 時間培養した。 37°C の HBSS または D-PBS でプレートを洗浄し未接着の細胞を除いた。接着した細胞数は約 $1\times 10^6\text{cells/well}$ であった。細胞刺激物とともに 1 ml または 500 μl の FCS-RPMI を加え、 37°C 、5% CO_2 で培養した。培養時間は主に 24 時間であるが、必要に応じて変更した。培養後、プレートを遠心分離して上清をマイクロチューブに採取し、 -80°C に保存した。

6. サイトカインの測定

マウスサイトカインについては、得られた検体について市販のサイトカイン測定キットを用いて定量した。IL-1 α 、IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-12、IL-10、IFN γ 及び TNF- α については、InterTestTM(Genzyme, Cambridge, Mass., USA)、BIOTRAKTM (Amersham, Buckinghamshire, England)、CytoscreenTM (Biosource International, Inc., Camarillo, Calif., USA) を、IL-13 については ANALYZA^R (TECHNE Co., Minneapolis, Minn., USA) を、

IL-18 については Mouse IL-18 ELISA Kit (Medical & Biological Laboratories Co., LTD., 名古屋) を用いた。

7. リポ多糖(LPS)の分析

rCTB その他の試料に含まれる LPS の量は リムルステスト (エンドスペーシー; 生化学工業、東京) によって測定した。

1. 第一章の実験

1-1. cAMP の産生誘導とその測定

M ϕ を一般事項 5 の通りに採取し、接着細胞が 24 ウェル培養プレートに約 1×10^6 cells/well となるようにした。市販のコレラ毒素 [(Sigma-Aldrich Co. (SIG)、St Louis, Mo., USA 及び List Biological laboratories Inc. (LBL)、Campbell, Calif., USA)]、市販のコレラ毒素 B サブユニット [(SIG、LBL、及び Research Biochemicals Inc. (RBI)、Natick, Mass., USA)]、及び rCTB を刺激物として加え、37°C、5%CO₂ で 2 時間培養した。1M 塩酸 50 μ l/well を加えて反応を止め、凍結融解を繰り返して細胞を破壊後、500 \times g、5 分間遠心分離した上清を検体とした。検体中の cAMP 濃度を市販の cAMP 測定キット (Cayman Chemical Co., Mich., USA) によって測定した。

1-2. マウス M ϕ によるサイトカイン産生

M ϕ を一般事項 5 の通りに採取し、接着細胞が 24 ウェル培養プレートに約 1×10^6 cells /well となるようにした。IL-1 を産生させる場合は、1 μ g/ml LPS (*Escherichia coli* type O111:B4 由来; SIG) となるように、IL-12 を産生させる場合は、1 μ g/ml LPS 及び 100 U/ml IFN γ (Genzyme, Cambridge,

Mass., USA) となるように加え、同時に rCTB または CT を加えた。37°C、5%CO₂ で 24 時間培養した後、プレートを 500×g、10 分間の冷却遠心によって上清を採取し、-80°Cに保存した。検体中のサイトカインは一般事項 6 に従い定量した。

2. 第二章の実験

2-1. 免疫

7 週齢の雌 BALB/c マウスを用い、エーテルによる軽麻酔下で、50 µg OVA 溶液または DT 5 Lf を 20 µl とし、初回経鼻投与後 2、3、4、5 週目に同量を追加経鼻投与した。粘膜アジュバントとして rCTB または CT を加える場合は、それぞれ 10 または 1 µg /マウスとなるように上記抗原液に添加した。採血は初回経鼻免疫後 1 週目から開始し、毎週経鼻投与前に行った。初回経鼻投与後 6 週目には、採血後に脾臓を採取した。

Lf (Limit of flocculation) とは、トキシイドまたは毒素の量を表す単位で、抗毒素との結合力で示される。標準品 1 単位の抗毒素と最も速やかに綿状の凝集物の生成を起こす毒素またはトキシイドの量を 1Lf という。

2-2. 免疫マウス脾臓細胞の抗原二次刺激

免疫マウスの脾臓から、一般事項 4 に従って 1×10^7 cells/ml に調整した脾臓細胞浮遊液を、500 µl ずつ 24 ウェル培養プレートに分注し (5×10^6 cells/well)、二次刺激抗原として 1 mg/ml OVA を 500 µl ずつ加えて、37°C、5%CO₂ で 24 時間培養した。培養後、プレートを 500×g、10 分間冷却遠心分離することによって上清を採取し-80°Cに保存した。検体中のサイトカインは一般事項 6 に従い定量した。

2-3. NALTからのリンパ球の調製

免疫したマウスを麻酔後心採血して安楽殺し、上顎と下顎の間で切断した。上顎について眼球より後の頭部及び鼻部先端を切断し、筋肉、骨及び歯を取り除き口蓋を取り出した。NALT は、口蓋後部の左右両側に位置しているので、それを培地の中でピンセット先端で丁寧に削り取った。得られた細胞をメッシュでろ過したものを NALT 細胞浮遊液として用いた。

2-4. ELISPOT 法

ELISPOT 用プレート (MultiScreen、ミリポア) の各ウェルに 50 μ l の 0.1M 炭酸緩衝液で希釈した一次抗体 (抗サイトカイン抗体) を加え、4°C で 18 時間インキュベートした。プレートを PBS で 3 回洗浄後、5%BSA を含む PBS で 37°C、30 分ブロッキングした。各ウェルに 100 μ l FCS-RPMI を加え、37°C、10 分インキュベートした後、 1×10^7 cells/ml に調整した脾臓または NALT の細胞浮遊液を 100 μ l 加えた。これに二次刺激抗原として DT を 終濃度 1 μ g/ml となるように加えて 20 時間、37°C でインキュベートした。プレートを 0.25% Tween20 を含む PBS で 10 回洗浄した後、1%BSA 及び 0.05% Tween20 を含む PBS で希釈したビオチン標識抗サイトカイン抗体を 50 μ l 加え 4°C で一晩インキュベートした。プレートを PBS-T で 4 回洗浄後 1%FCS を含む PBS-T で希釈した西洋わさびペルオキシダーゼ標識アビジン 50 μ l を加え室温で 2 時間インキュベートした。PBS-T でプレートを 6 回洗浄後、後述の発色液 200 μ l を加え、室温で 30 分反応させた。その後、蒸留水で 3 回洗浄したプレートを乾燥し、実体顕微鏡下で赤いスポットを計数した。

発色液は、以下の通りに調製した。Dimethylformamide 1 ml に 10 mg の 3-amino-9-ethylcarbazole を溶かし、0.1M の酢酸緩衝液 (pH5.0) を 30 ml 加えてろ過した後 30% H_2O_2 を 15 μ l 加えた。

抗サイトカイン抗体は、一次抗体とビオチン標識二次抗体とのセットを

IL-4、5 については、Endogen (Mass., USA)、IL-2、6、10、IFN γ については、Pharmingen (Calif., USA) より購入した。

2-5. 統計的解析

本章においては、二群間の有意差検定を Student の t 検定により行った。危険率 5% 以下で有意差があったとした。

3. 第三章の実験

3-1. 免疫方法

$10^5 \sim 10^7$ CFU の BCG [日本ビーシージー製造 (株)、東京] を $10 \mu\text{g} \sim 50 \mu\text{g}$ の rCTB 存在下または非存在下で、接種容量がモルモットにおいては一匹あたり $20 \mu\text{l} \sim 200 \mu\text{l}$ に、マウスにおいては $20 \mu\text{l}$ になるように生理的食塩水を用いて調整し、エーテルによる軽麻酔下でマイクロピペットによって経鼻投与した。

3-2. 遅延型過敏反応の測定

3-2-1. モルモット皮膚反応

BCG 接種後 5~6 週目に、腹側部を脱毛し、精製ツベルクリン (PPD) [日本ビーシージー製造 (株)、東京] 0.05 、 0.1 、 $0.2 \mu\text{g}$ の 0.1 ml 溶液を皮内注射し、24 時間後に硬結の径を測定した。

3-2-2. マウス足蹠反応

BCG 接種後 6 週目にマウス後肢足蹠に PPD $10 \mu\text{g}$ 含む生理食塩水 $50 \mu\text{l}$ を皮内注射した。もう一方の足蹠には生理食塩水 $50 \mu\text{l}$ を注射し対照とし

た。24 時間後にダイヤルシックネスゲージ（尾崎製作所、東京）を用いて足の厚さを測定した。

3-3. 脾臓細胞の抗原二次刺激

免疫マウス及びモルモットの脾臓細胞は、一般事項 4 に従って調製した。 1×10^7 cells/ml の脾臓細胞浮遊液を 500 μ l ずつ 24 ウェル培養プレートに分注し、刺激抗原として終濃度 10 μ g/ml となるように PPD を加えて、37°C、5%CO₂ で 24 時間培養した。同時に polymyxin B を終濃度 10 μ g/ml となるように加え、PPD に混入する恐れのある LPS の影響を妨害した。培養後、プレートを 500 \times g、10 分間冷却遠心分離して上清を採取し、-80°C に保存した。

3-4. 抗原特異的脾臓細胞増殖反応の測定

一般事項 4 に従って調製した脾臓細胞浮遊液を 2×10^6 cells/ml になるように調整し、その 100 μ l ずつを U 底 96 ウェルマイクロプレート (FALCON) の各ウェルに入れた。0、0.1、1、10 μ g/ml に調製した PPD を 100 μ l ずつ各ウェルに加え、37°C、5%CO₂ で 5 日間培養した。培養終了 18 時間前に 3.7 kBq の [³H] thymidine (Amersham Biosciences) を各ウェルに加えた。セルハーベスター (TOMTEC, Conn., USA) を用いて、細胞をグラスファイバーフィルター (Wallac Oy, Turku, Finland) に採取し、乾燥後に固形シンチレーター (Wallac Oy) をフィルターにのせ、それをヒーターで融解してフィルターに浸透させた後に冷却して、シンチレーションカウンターで測定した。

3-5. モルモット TNF- α の定量

モルモット脾臓細胞培養上清中の TNF- α の定量は、actinomycin D 存在下での L929 細胞に対する細胞毒性を測定することによって定量した (80)。

単層培養した L929 細胞を 0.25%trypsin で処理し、 4×10^5 cells/ml の細胞浮遊液を 96 ウェル平底マイクロプレートに 100 μ l ずつ分注し、37°C、5% CO₂ で 24 時間培養した。培養液は、5%FCS、100 単位/ml penicillin、100 μ g/ml streptomycin を含む RPMI-1640 (Phenol red free, GIBCO, 東京) を用いた。別の U 型マイクロプレートに FCS を加えない上記の培養液を 110 μ l ずつ分注し、検体の 2 倍希釈列を作成した。各希釈検体は、50 μ l/well ずつ L929 細胞に加えた。次いで、8 μ g/ml actinomycin D (Sigma-Aldrich Co.) を含む培養液 (FCS free) を 50 μ l/well ずつ加えて 37°C、5%CO₂ で 18 時間培養した。培養液に WST-1/1-methoxy PMS 溶液 (同仁堂、熊本) を 20 μ l/well ずつ加えてさらに 2 時間培養後、生細胞コントロールが黄色に発色したことを確認し、0.5M 硫酸を 30 μ l/well ずつ加えて、発色を停止させた。生細胞コントロールは検体のかわりに培養液を加えたものを、一方、死細胞コントロールは、組換えマウス TNF- α (Calbiochem-Novabiochem. Co., La Jolla, Calif., USA) を 50 ng/ml の濃度で含む培養液を用いた。655 nm での吸光度を対照として、450 nm での吸光度をマイクロプレートリーダーによって測定した。上記の組換えマウス TNF- α (50 ng/ml) から 2 倍希釈列を作成し、生細胞コントロールでの吸光度を 100%、死細胞コントロールでの吸光度を 0%とし、吸光度が 50%になる時の TNF- α の濃度をその希釈倍率から求めた。これを元にコントロールでの 50%の吸光度を示す検体の希釈倍率を求め、検体中の TNF- α 量を求めた。

3-6. 統計的解析

本章においては、二群間の有意差検定をノンパラメトリック法である Mann-Whitney の U 検定により行った。危険率 5%以下で有意差があるとした。

4. 第四章の実験

4-1. M ϕ と骨髄細胞の刺激物処理

M ϕ は一般事項 5 に従って採取したものをを用いた。骨髄細胞は以下の方法によって採取した。まず腹腔細胞を採取したマウスの大腿骨を切り取り、両端を切除し、23G の針を付けた注射筒を用いて培地を注入して、骨髄細胞を HBSS 中に押し出した。これを HBSS で 3 回洗浄して、最後に FCS-RPMI に懸濁させ、細胞浮遊液を得た。M ϕ と骨髄細胞の浮遊液を 1×10^6 cells /ml に調整し、24 ウェル培養プレートに 1 ml ずつ分注した。

IL-1 β を産生させる刺激物として、以下の物質を（ ）に示した濃度になるように、細胞培養液中に添加した。

LPS (0.1~1000 ng/ml)、Taxol (4 μ M)、IFN γ (100~2000U/ml)、ionomycin (1 μ M)、calcium ionophore A23187 (1 μ M)、12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA) (1 μ M) (以上 Sigma-Aldrich Co.)、Sansonin (0.05%)、Pansorbin (0.05%)、PGN (100 μ g/ml)、TNF- α (25 ng/ml) (以上 Calbiochem-Novabiochem. Co.)、CpG モチーフを含むオリゴ DNA (CpG-DNA) (10 μ g/ml、100 μ g/ml)

CpG-DNA は、下記の塩基配列 (81) を(株)タカラバイオ (滋賀) にカスタム DNA 合成を依頼した。

CpG-DNA : 5'-ACCGAT AACGTT GCCGGT GACGGC ACCAGC -3'

前述の M ϕ と骨髄細胞浮遊液にこれら刺激物を加え 37°C、5%CO₂ で 24 時間培養後、プレートを 500 \times g、10 分間の冷却遠心によって上清を採取し、-80°Cに保存した。プレート上の付着細胞について細胞内サイトカインを測定する場合は、1 mM PMSF 及び 0.05% Triton X-100 を含む HBSS で可溶化したものを検体とし、mRNA 発現を調べる場合は、RNA 抽出試薬を加えて十分に溶解した後、マイクロチューブに採取し、-80°Cに保存した。

4-2. RT-PCR による分析

Mφの全 RNA は、市販の抽出キットである TRIzol (Invitrogen Co., Carlsbad, Calif., USA) を用い、AGPC 法によって行った。1×10⁶ 個の Mφ に 1 ml の RNA 抽出試薬を加え、RNA の沈殿を得た。これに 100 μl の diethylpyrocarbonate 処理水を加え、必要に応じて、更に DNase I 処理をし、RNA 精製キットの RNeasy (キアゲン、東京) によって精製 RNA 標品を得た。逆転写反応による 1st strand cDNA の合成は、ランダムヘキサマーを用いて市販のキットの Gene Amp RNA PCR Kit (Perkin-Elmer, Norwalk, Con., USA) で行った。合成された鋳型 DNA は-20℃で保存した。

PCR は 1 μM プライマー、及び 0.625 U の Taq ポリメラーゼ (TaKaRa Ex Taq) で、添付の緩衝液及び基質を用い、サーマルサイクラー (GeneAmpPCR system 9700, Perkin-Elmer) で反応させた。電気泳動は Mupid 21 ミニゲル泳動槽 (コスモバイオ) を用い、2%アガロースゲル (Relient gel system, BioWhittake Molecular Applications, Rockland, Maine, USA) 上で行った。泳動後に ethidium bromide で染色し、紫外線照射による蛍光を撮影した。

プライマーは、IL-1β及びβ-アクチンについては市販のプライマーセット (Continental Laboratory Products, San Diego, Calif., USA) を、MyD88 (82)、TLR2 (75)、TLR4 (75) については下記のプライマーセットを用いた。

MyD88 : 5'-ATGTTCTTCATACCCTTG-3'
 : 5'-ACTGCTTTCCACTCTGGC-3'
TLR2 : 5'-CAGCTTAAAGGGCGGGTCAGAG-3'
 : 5'-TGGAGACGCCAGCTCTGGCTCA-3'
TLR4 : 5'-AGTGGGTCAAGGAACAGAAGCA-3'
 : 5'-CTTTACCAGCTCATTTCTCACC-3'

各プライマーセットの上が sense、下が antisense である。

それぞれの検体は、 β -アクチン cDNA 量を内部標準として、2 倍系列希釈して PCR を行い、発現量を比較し、 β -アクチン cDNA 量が等しくなるように希釈した。また、サイクル数は、15 回から 40 回行い、増幅がプラトーに達する前のものを用いた。逆転写を行っていない検体についても PCR を行い、細胞由来の DNA の混入を確認したが、用いたプライマーでは、増幅が認められなかった。

4-3. 統計的解析

本章においては、二群間の有意差検定を Student の t 検定により行った。危険率 5%以下で有意差があるとした。

【引用文献】

- (1) Oya, A. 1996. Philosophy and History of Vaccines, p.1-4, *In* Oya, A., Asano, T., Chino, F., Katow, S., Miyamura, T., Nakamura, R., Sato, H. (eds.), Vaccine handbook, Maruzen, Tokyo
- (2) McGhee, J.R., Mestecky, J., Dertzbaugh, M.T., Eldridge, J.H., Hirasawa, M., and Kiyono, H. 1992. The mucosal immune system from fundamental concepts to vaccine developement. *Vaccine* **10**: 75-88.
- (3) McGhee, J.R., Lamm, M.E., and Strober, W. 1999. Mucosal Immune responses, p.485-506. *In* Ogra, P. L., Mestecky, J., Lamm, M. E., Strober, W., Bienenstock, J., and McGhee, J.R. (eds.), *Mucosal Immunology*, 2nd ed., Academic Press, San Diego.
- (4) Levine, M., and Dougan, G. 1998. Optimism over vaccines administered via mucosal surfaces. *Lancet* **351**: 1375-1376.
- (5) Sanderson, I.R., and Walker, W.A. 1999. Mucosal Barrier: An Overview, p.5-17. *In* Ogra, P. L., Mestecky, J., Lamm, M. E., Strober, W., Bienenstock, J., and McGhee, J.R. (eds.), *Mucosal Immunology*, 2nd ed., Academic Press, San Diego.
- (6) Elson, C.O., and Dertzbough, M.T. 1999. Mucosal adjuvants, p.817-838. *In* Ogra, P. L., Mestecky, J., Lamm, M. E., Strober, W., Bienenstock, J., and McGhee, J.R. (eds.), *Mucosal Immunology*, 2nd ed., Academic Press, San Diego.
- (7) Czerkinsky, C., Russell, M.W., Lycke, N., Lindblad, M., and Holmgren, J. 1989. Oral administration of a streptococcal antigen coupled to cholera toxin B subunit evokes strong antibody responses in salivary glands and extramucosal tissues. *Infect. Immun.* **57**: 1072-1077.

- (8) Liang, X., Lamm, M.E., and Nedrud, J.G. 1988. Oral administration of cholera toxin-Sendai virus conjugate potentiates gut and respiratory immunity against Sendai virus. *J. Immunol.* **141**: 1495-1501.
- (9) Michalek, S. M., O'hagan, D. T., Gould-Fogerite, S., Rimmelzwaan, G.F., and Osterhous, A.D.M.E. 1999. Antigen delivery system, p.759-778. *In* Ogra, P. L., Mestecky, J., Lamm, M. E., Strober, W., Bienenstock, J., and McGhee, J.R. (eds.), *Mucosal Immunology*, 2nd ed., Academic Press, San Diego.
- (10) Elson, C.O., and Ealiding, W. 1984. Generalized systemic and mucosal immunity in mice after mucosal stimulation with cholera toxin. *J. Immunol.* **132**: 2736-2741.
- (11) Lycke, N., and Holmgren, J. 1986. Strong adjuvant properties of cholera toxin on gut mucosal immune responses to orally presented antigens. *Immunology* **59**: 301-308.
- (12) Holmgren, J., Lycke, N., and Czerkinsky, C. 1993. Cholera toxin and cholera B subunit as oral mucosal adjuvant and antigen vector systems. *Vaccine* **11**: 1179-1184.
- (13) Wilson, A.D., Clarke, C.J., and Stokes, C.R. 1990. Whole cholera toxin and B subunit act synergistically as an adjuvant for the mucosal immune response of mice to keyhole limpet haemocyanin. *Scand. J. Immunol.* **31**: 443-451.
- (14) Holmgren, J. 1981. Actions of cholera toxin and the prevention and treatment of cholera. *Nature* **292**: 413-417.
- (15) Yamamoto, S., Kiyono, H., Yamamoto, M., Imaoka, K., Yamamoto, M., Fujihashi, K., Van Ginkel, F. W., Noda, M., Takeda, Y., and McGhee, J.R. 1997. A nontoxic mutants of cholera toxin elicited Th2-type responses for enhanced mucosal immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**: 5267-5272.

- (16) Yamamoto, S., Takeda, Y., Yamamoto, M., Kurazono, H., Imaoka, K., Yamamoto, M., Fujihashi, K., Noda, M., Kiyono, H., and McGhee, J.R. 1997. Mutants in the ADP-ribosyltransferase cleft of cholera toxin lack diarrheagenicity but retain adjuvanticity. *J. Exp. Med.* **185**: 1203-1210.
- (17) Tamura, S., Yamanaka, A., and Shimohara, M. 1994. Synergistic action of cholera toxin B subunit (and *Escherichia coli* heat-labile toxin B subunit) and a trace amount of cholera whole toxin as an adjuvant for nasal influenza vaccine. *Vaccine* **12**: 419-426.
- (18) Ichikawa, Y., Yamagata, H., Tochikubo, K., and Udaka, S. 1993. Very efficient extracellular production of cholera toxin B subunit using *Bacillus brevis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **111**: 219- 224.
- (19) Yasuda, Y., Matano, K., Asai, T., and Tochikubo, K. 1998. Affinity purification of recombinant cholera toxin B subunit oligomer expressed in *Bacillus brevis* for potential human use as a mucosal adjuvant. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **20**: 311-318.
- (20) Goto, N., Maeyama, J., Yasuda, Y., Isaka, M., Matano, K., Kozuka, S., Taniguchi, T., Miura, Y., Ohkuma, K., and Tochikubo, K. 2000. Safety evaluation of recombinant cholera toxin B subunit produced by *Bacillus brevis* as a mucosal adjuvant. *Vaccine* **18**: 2164-2171.
- (21) Isaka, M., Yasuda, Y., Kozuka, S., Miura, K., Taniguchi, T., Matano, K., Goto, N., and Tochikubo, K. 1998. Systemic and mucosal immune responses of mice to aluminium-adsorbed or aluminium-non-adsorbed tetanus toxoid administered intranasally with recombinant cholera toxin B subunit. *Vaccine* **16**: 1620-1626.
- (22) Isaka, M., Yasuda, Y., Kozuka, S., Taniguchi, T., Matano, K., Maeyama, J., Komiya, T., Ohkuma, K., Goto, N., and Tochikubo, K. 2000. Induction of systemic and mucosal antibody responses in mice immunized intranasally with aluminium-non-adsorbed diphtheria toxoid together

with recombinant cholera toxin B subunit as an adjuvant. *Vaccine* **18**: 743-751.

- (23) Isaka, M., Yasuda, Y., Mizokami, M., Kozuka, S., Taniguchi, T., Matano, K., Maeyama, J., Mizuno, K., Morokuma, K., Ohkuma, K., Goto, N., and Tochikubo, K. 2001. Mucosal immunization against hepatitis B virus by intranasal co-administration of recombinant hepatitis B surface antigen and recombinant cholera toxin B subunit as an adjuvant. *Vaccine* **19**:1460-1466.
- (24) Isaka, M., Yasuda, Y., Taniguchi, T., Kozuka, S., Matano, K., Maeyama, J., Morokuma, K., Ohkuma, K., Goto, N., and Tochikubo, K. 2003. Mucosal and systemic antibody responses against an acellular pertussis vaccine in mice after intranasal co-administration with recombinant cholera toxin B subunit as an adjuvant. *Vaccine* **21**: 1165-1173.
- (25) Isaka, M., Komiya, T., Takahashi, M., Yasuda, Y., Taniguchi, T., Zhao, Y., Matano, K., Maeyama, J., Morokuma, K., Ohkuma, K., Goto, N., and Tochikubo, K. 2004. Recombinant cholera toxin B subunit (rCTB) as a mucosal adjuvant enhances induction of diphtheria-pertussis-tetanus (DPT) combination vaccine. *Vaccine* **22**: 3061-3068.
- (26) Isaka, M., Yasuda, Y., Kozuka, S., Taniguchi, T., Miura, K., Matano, K., Goto, N., and Tochikubo, K. 1999. Intranasal or subcutaneous co-administration of recombinant cholera toxin B subunit stimulates only a slight or no level of the specific IgE response in mice to tetanus toxoid. *Vaccine* **17**: 944-948.
- (27) Lycke, N., Tsuji, T., and Holmgren, J. 1992. The adjuvant effect of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli* heat-labile enterotoxins is linked to their ADP-ribosyltransferase activity. *Eur. J. Immunol.* **22**: 2277-2281.

- (28) Tochikubo, K., Isaka, M., Yasuda, Y., Kozuka, S., Matano, K., Miura, Y., and Taniguchi, T. 1998. Recombinant cholera toxin B subunit acts as an adjuvant for the mucosal and systemic responses of mice to mucosally co-administered bovine serum albumin. *Vaccine* **16**: 150 -155.
- (29) Bromander, A.K., Holmgren, J., and Lycke, N. 1991. Cholera toxin stimulates IL-1 production and enhances antigen presentation by macrophages *in vitro*. *J. Immunol.* **146**: 2908-2914.
- (30) Lycke, N., Bromander, A.K., Ekman, L., Karlsson, U., and Holmgren, J. 1989. Cellular basis of immunomodulation by cholera toxin *in vitro* with possible association to the adjuvant function *in vivo*. *J. Immunol.* **142**: 20-27.
- (31) McGhee, D.W., Elson, C.O., and McGhee, J.R. 1993. Enhance effect of cholera toxin on interleukin-6 secretion by IEC-6 intestinal epithelial cells: mode of action and augmenting effect of inflammatory cytokines. *Infect. Immun.* **61**: 4637-4644.
- (32) Zhang, Y., Lin, J.-X., and Vilcek, J. 1988. Synthesis of interleukin 6 in human fibroblasts is triggered by increase in intracellular cyclic AMP. *J. Biol. Chem.* **263**: 6177-6182.
- (33) McGhee, D.W., Beagley, K.W., Aicher, W.K., and McGhee, J.R. 1993. Transforming growth factor- β and IL-1 β act in synergy to enhance IL-6 secretion by the intestinal epithelial cell line, IEC-6. *J. Immunol.* **151**: 970-978.
- (34) Arend, W. P., Joslin, F.G., and Massoni, J. 1985. Effects of immune complexes on production by human monocytes of interleukin 1 or an interleukin 1 inhibitor. *J. Immunol.* **134**: 3868-3875.
- (35) Dinarello, C.A. 1991. interleukin-1 or interleukin-1 antagonism. *Blood* **77**:1627-1652.

- (36) Kammer, G.M. 1988. The adenyl cyclase-cAMP-protein kinase A pathway and regulation of the immune response. *Immunology today* **9**: 222-229.
- (37) Trinchieri, G. 1994. Interleukin-12. *Blood*. **84**: 4008-4027.
- (38) Mosmann, T.R., and Coffman, R.L. 1989. Th1 and Th2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Ann. Rev. Immunol.* **7**: 145-173.
- (39) Xu, A.J., Kiyono, H., Jackson, R.J., Staats, H.F., Fujihashi, K., Burrows, P.D., Elson, C.O., Pillai, S., and McGhee, J.R. 1993. Helper T cell subsets for immunoglobulin A responses : oral immunization with tetanus toxoid and cholera toxin as adjuvant selectively induces Th2 cells in mucosal associated tissues. *J. Exp. Med.* **178** : 1309-1320.
- (40) Xu, A.J., Jackson, R.J., Fujihashi, K., Kiyono, H., Staats, H.F., and McGhee, J.R. 1994. Helper Th1 and Th2 responses following mucosal or systemic immunization with cholera toxin. *Vaccine* **12**: 903-911.
- (41) Hornquist, E., and Lycke, N. 1993. Cholera toxin adjuvant greatly promotes antigen priming of T cells. *Eur. J. Immunol.* **23**: 2136-2143.
- (42) McSorley, S.J., Rask, C., Pichot, R., Julia, V., Czerkinsky, C., and Glaichenhaus, N. 1998. Selective tolerization of Th1-like cells after nasal administration of a cholera toxoid-LACK conjugate. *Eur. J. Immunol.* **28**:424-432.
- (43) Wiedermann, U., Jahn-Schmid, B., Lindblad, M., Rask C., Holmgren, J., Kraft, D., and Ebner, C. 1999. Suppressive versus stimulatory effects of allergen/ cholera toxoid (CTB) conjugates depending on the nature of the allergen in a murine model of type I allergy. *Int. Immunol.* **11**:1131-1138.

- (44) Okahashi, N., Yamamoto, M., Kiyono, H., and McGhee, J.R. 1996. Mucosal immunity in IL-4 knock out mouse. *Infect. Immun.* **64**: 1516-1525.
- (45) Vajdy, M., Kosco-Vilbois, M.H., Kopf, M., Kohler, G., and Lycke, N. 1995. Impaired mucosal immune responses in interleukin-4-targeted mice. *J. Exp. Med.* **181**: 41-53.
- (46) Tominaga, A., and Takaki, S. 1991. Transgenic mice expressing a B cell growth and differentiation factor (interleukin-5) develop eosinophilia and autoantibody production. *J. Exp. Med.* **173**: 429-437.
- (47) Ramsey, A.J., and Kohonen, C. M. 1993. Interleukin-5 expressed by a recombinant virus vector enhances specific mucosal IgA responses *in vivo*. *Eur. J. Immunol.* **23**: 3141-3145.
- (48) Husband, A.J., Beagley, K. W., and McGhee, J.R. 1999. Mucosal cytokines, p.541-557. *In* Ogra, P. L., Mestecky, J., Lamm, M. E., Strober, W., Bienenstock, J., and McGhee, J.R. (eds.), *Mucosal Immunology*, 2nd ed., Academic Press, San Diego.
- (49) Coffman, R.L., Lebman, D. A., and Shrader, B. 1989. Transforming growth factor beta specifically enhances IgA production by lipopolysaccharide-stimulated murine B lymphocytes. *J. Exp. Med.* **170**: 1039-1044.
- (50) Kim, P.H., Eckmann, L., Lee, W. J., Han, W., and Kagnoff, M.F. 1998. Cholera toxin and cholera toxin B subunit induce IgA switching through the action of TGF- β 1. *J. Immunol.* **160**: 1198-1203.
- (51) Kim, P.H., and Kagnoff, M.F. 1990. Transforming growth factor β 1 is a costimulator for IgA production. *J. Immunol.* **144**: 3411-3421.
- (52) Rocken, M., Muller, K.M., Saurat, J.-H., Muller, I., Louis, J.A., Cerottini,

- J.-C., and Hauser, C. 1992. Central role for TCR/CD3 ligation in the differentiation of CD4⁺ T cells toward a Th1 or Th2 functional phenotype. *J. Immunol.* **153**:3514-3522.
- (53) Sad, S., and Mosmann, T.R. 1994. Single IL-2-secreting precursor CD4 T cell can develop into either Th1 or Th2 cytokine secretion phenotype. *J. Immunol.* **148**:47-54.
- (54) Street, N.E., Schumacher, J.H., Fong, T.A.T., Bass, H., Fiorentino, D.F., Leverah, J.A., and Mosmann, T.R. 1990. Heterogeneity of mouse helper T cells. *J. Immunol.* **144**: 1629-1639.
- (55) Biet, F., Kremer, L., Wolowczuk, I., Delacre, M., and Loch, C. 2003. Immune response induced by recombinant *Mycobacterium bovis* BCG producing the cholera toxin B subunit. *Infect. Immun.* **71**: 2933-2937.
- (56) Falero-Diaz, G., Challacombe, S., Banerjee, D., Douce, G., Boyd, A., and Ivanyi, J. 2000. Intranasal vaccination of mice against infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Vaccine* **18**: 3223-3229.
- (57) Huygen, K., Abramowicz, D., Vandenbussche, P., Jacobs, F., Bruyn, J.D., Kentos, A., Drowart, A., Vooren, J.-P. V., and Goldman, M. 1992. Spleen cell cytokine secretion in *Mycobacterium bovis* BCG-infected mice. *Infect. Immun.* **60**: 2880-2886.
- (58) Wakeham, J., Wang, J., and Xing, Z. 2000. Genetically determined disparate innate and adaptive cell-mediated immune responses to pulmonary *Mycobacterium bovis* BCG infection in C57BL/6 and BALB/c mice. *Infect. Immun.* **68**: 6946-6953.
- (59) Yoshida, A., Koide, Y., Uchijima, M., and Yoshida, T. O. 1995. Dissection of strain difference in acquired protective immunity against *Mycobacterium bovis* Calmette-Guérin Bacillus (BCG). *J. Immunol.* **155**: 2057-2066.

- (60) Rock, F.L., Hardiman, G., Timans, J. C., Kastelein, R.A., and Bazan, J. F., 1998 .A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:588-593.
- (61) Hoffmann, J.A., Kafatos, F.C., Janeway, C.A., and Ezekowitz, R.A.B. 1999. Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* **284**:1313-1318.
- (62) Imler, J.-L., and Hoffmann, J.A. 2001. Toll receptors in innate immunity. *Trends in Cell Biol.* **11**: 304-310.
- (63) Chuang, T.-H. , and Ulevitch, R. J. 2001. Identification of hTLR10: a novel human Toll-like receptor preferentially expressed in immune cells. *Biochim. Biophys. Acta.* **1518**(1-2):157-161.
- (64) Lien, E., Means, T.K., Heine, H., Yoshimura, A., Kusumoto, S., Fukase, K., Fenton, M.J., Oikawa, M., Qureshi, N., Monks, B., Finberg, R.W., Ingalls, R.R., and Golenbock, D.T. 2000. Toll-like receptor 4 imparts ligand-specific recognition of bacterial lipopolysaccharide. *J. Clin Invest.* **105**(4): 497-504
- (65) Bogdan, C., and Ding, A. 1992. Taxol, a microtubule-stabilizing antineoplastic agent, induces expression of tumor necrosis factor α and interleukin-1 in macrophages. *J. Leuko. Biol.* **52**:119-121.
- (66) Kawasaki, K., Akashi, S., Shimazu, R., Yoshida, T., Miyake, K., Nishijima, M. 2000. Mouse Toll-like receptor 4. MD-2 complex mediates lipopolysaccharide-mimetic signal transduction by taxol. *J. Biol. Chem.* **275**:2251-2254.
- (67) Kawasaki, K., Gomi, K., Nishijima, M. 2001. Cutting edge: Gln22 of mouse MD-2 is essential for species-specific lipopolysaccharide mimetic action of taxol. *J. Immunol.* **66**:11-14.

- (68) Takeuchi, O., Hoshino, K., Kawai, T., Sanjo, H., Takada, H., Ogawa, T., Takeda, K., and Akira, S. 1999. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* **11**: 443-451.
- (69) Liu, Y., Wang, Y., Yamakuchi, M., Isowaki, M., Nagata, E., Kanmura, Y., Kitajima, I., and Maruyama, I. 2001. Upregulation of Toll-like receptor 2 gene expression in macrophage response to peptidoglycan and high concentration of lipopolysaccharide is involved in NF- κ B activation. *Infect. Immun.* **69**: 2788-2796.
- (70) Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K., and Akira, S. 2000. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* **408**:740-744.
- (71) Kaisho, T., and Akira, S. 2001. Dendritic-cell function in Toll-like receptor- and MyD88- knockout mice. *Trends in Immunol.* **22**:78-83.
- (72) Takeuchi, O., and Akira, S. 2001. Toll-like receptors; their physiological role and signal transduction system. *Int. Immunopharmacol.* **1**:625-635.
- (73) Nakae, S., Asano, M., Horai, R., Sakaguchi, N., and Iwakura, Y. 2001. IL-1 enhances T cell-dependent antibody production through induction of CD40 ligand and OX40 on T cells. *J. Immunol.* **167**:90-97.
- (74) Nakae, S., Asano, M., Horai, R., and Iwakura, Y. 2001. IL-1 β , but not IL-1 α is required for T cell-dependent antibody production. *Immunology* **104**:402-409.
- (75) Matsuguchi, T., Takagi, K., Musikacharoen, T., and Yoshikai, Y. 2000. Gene expressions of lipopolysaccharide receptors, Toll-like receptors 2 and 4, are differently regulated in mouse T lymphocytes. *Blood* **95**:1378-1385.

- (76) Ogata, H., Su, I., Miyake, K., Nagai, Y., Akashi, S., Mecklenbrauker, I., Rajewsky, K., Kimoto, M., and Tarakhovsky, A. 2000. The Toll-like receptor protein RP105 regulates lipopolysaccharide signaling in B cells. *J. Exp. Med.* **192**:23-29 .
- (77) Hornung, V., Rothenfusser, S., Britsch, S., Krug, A., Jahrsdorfer, B., Giese, T., Endres, S., and Hartmann, G. 2002. Quantitative expression of Toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J. Immunol.* **168**: 4531-4537.
- (78) Medzhitov, R., and Janeway, C.A. 1997. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr. Opin. Immunol.* **9**: 4-9.
- (79) Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., and Janeway, C.A. 1997. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* **388**:394-397.
- (80) Brightbill, H.D., and Modlin, R.L. 2000. Toll-like receptors: molecular mechanisms of the mammalian immune response. *Immunol.* **101**: 1-10.
- (81) Flick, D.A., and Gifford, G.E. 1984. Comparison of *in vitro* cell cytotoxic assays for tumor necrosis factor. *J. Immunol. Methods* **68**: 167-175.
- (82) Yamamoto, T., Yamamoto, S., Kataoka, T., Komuro, K., Kohase, M., and Tokunaga, T. 1994. Synthetic oligonucleotides with certain palindromes stimulate interferon production of human peripheral blood lymphocytes *in vitro* . *Jpn. J. Cancer Res.* **85**: 775-779.
- (83) Makiishi-Shimobayasi, C., Tujiyama, T., Iwasaki T., Yamada, N., Sugihara, A., Okamura, H., Hayashi, S., and Terada, N. 2001. Interleukin-18 up regulates osteoprotegerin expression in stromal/osteoblastic cells. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **281**: 361-366.

